



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Campus de Araraquara

AMANDA KOBERSTAIN SURUR

OTIMIZAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA EM *S. aureus*  
VIA INIBIÇÃO DA CATALASE

Araraquara, SP

2022

**AMANDA KOBERSTAIN SURUR**

**OTIMIZAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA EM *S. aureus*  
VIA INIBIÇÃO DA CATALASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre, área de pesquisa em Microbiologia Clínica.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Raquel Fontana Mendonça

**Araraquara, SP**

**2022**

---

**S961o** Surur, Amanda Koberstain.  
Otimização da terapia fotodinâmica antimicrobiana em *S. aureus* via  
inibição da catalase / Amanda Koberstain Surur. – Araraquara: [S.n.], 2022.  
74 f. : il.

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

Orientadora: Carla Raquel Fontana Mendonça.

1. Terapia Fotodinâmica Antibacteriana. 2. Azul de Metileno. 3. Curcumina.  
4. Catalase. 5. 3-amino-1,2,4-triazol. I. Mendonça, Carla Raquel Fontana, orient.  
II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** Otimização da Terapia Fotodinâmica em *S. aureus* via inibição da Catalase

**AUTORA:** AMANDA KOBERSTAIN SURUR

**ORIENTADORA:** CARLA RAQUEL FONTANA MENDONÇA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. CARLA RAQUEL FONTANA MENDONÇA (Participação Virtual)  
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Dr. TÚLIO MORANDIN FERRISSE (Participação Virtual)  
Centro de Pesquisa em Ótica e Fotônica / Câmpus de São Carlos da Universidade de São Paulo - USP

Profa. Dra. NATÁLIA MAYUMI INADA (Participação Virtual)  
Instituto de Física de São Carlos - USP

Araraquara, 26 de setembro de 2022

Dedico esse trabalho à pessoa que mais lutou para estar onde estou, sempre dando amor, carinho, sendo extremamente generosa e exemplo de mãe, profissional e ser humano. Sem você não estaria onde estou. Te amo para sempre, mãe.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente à minha mãe Luciana Koberstain por tudo. Por ser minha base, meu modelo, minha força, por lutar minhas batalhas, cuidar e me amar sem precedentes. Te amo profundamente!

Agradeço do fundo do meu coração à minha avó Sonia Rosali Miguel Vianna, que mesmo em toda sua intensidade, é uma das pessoas mais dedicadas que conheço. Sei que não foi fácil me ver longe, mas sempre me recebia e se despidia com um sorriso. Te amo muito!

Agradeço ao meu avô, Rodolfo Koberstain, por ter sido quase meu pai, por ser a rocha da nossa família e por sempre ter uma palavra de carinho. Te amo muito, meu vóio!

Agradeço à minha avó Vicentina Koberstain, por cuidar de mim desde pequena, sempre brincando comigo e fazendo minhas vontades, por sempre ter um abraço carinhoso para dar. Te amo!

Agradeço ao meu pai, Paulo Surur, pelo apoio e oportunidade de chegar até essa etapa com qualidade de ensino.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Carla Raquel Fontana, por ter acreditado na minha capacidade, por ter aberto o laboratório e confiar no que estava fazendo. Muito obrigada!

Agradeço à Sarah Raquel de Annunzio, por ser quase uma coorientadora não oficial, sempre ajudando no que podia e respondendo às milhões de mensagens. Muito obrigada!

Por fim, agradeço a todo o Laboratório de Biofotônica, por ser formado de pessoas incríveis e que me receberam muito bem. Obrigada, de verdade.

# Capítulo 1

## RESUMO

Uma alternativa ao combate ao uso irracional de antimicrobianos é a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa), uma forma moderna e não invasiva de terapia, a qual tem seu mecanismo de ação fundamentado na ativação pela irradiação de um fotossensibilizador (FS) na presença de oxigênio e sob fluências específicas de luz no comprimento de onda adequado. O objetivo desse estudo é avaliar possíveis alterações da ação antimicrobiana da TFDa mediadas por Azul de metileno (AM) e Curcumina (CUR) na presença do inibidor de catalase 3-AT sobre *S. aureus* ATCC 25923 em fase planctônica. Para tanto foram realizados os testes de Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) sobre o 3-AT através do método de microdiluição, a avaliação da fotodegradação dos FS, a padronização dos parâmetros ideais de TFDa e a avaliação de sinergismo entre TFDa e 3-AT em diferentes tempos de inibição (10 a 40 minutos). A análise estatística dos dados foi feita através do teste de Análise de Variância (*one-way* ou *two-way* ANOVA) com pós-teste de Tukey. O 3-AT não apresentou MIC e CBM para as concentrações avaliadas e demonstrou um padrão de redução do crescimento bacteriano na presença do inibidor, sem morte bacteriana após a retirada do mesmo. Os parâmetros ideais para TFDa mediada por AM solubilizada em salina estéril e por CUR dissolvida em DMSO 1% e sacarose 0,5% foram 10 minutos de pré-irradiação, 50 µg/mL AM, 72,96 mW/cm<sup>2</sup>, 65,66 J/cm<sup>2</sup> e 30 minutos de pré-irradiação, 6,25 µg/mL CUR, 55 mW/cm<sup>2</sup> e 25 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Na terapia combinada (TC) entre TFDa e 3-AT foram avaliados diferentes tempos de inibição da catalase necessário para redução bacteriana total. Com isso, pode-se concluir que a TC demonstrou possuir sinergismo entre TFDa e 3-AT, ser dependente do tempo de inibição da catalase e do tempo de pré-irradiação dos FSs e ter grande potencial para estudos futuros.

**Palavras-chave:** Terapia Fotodinâmica Antibacteriana. Azul de Metileno. Curcumina. Catalase. 3-amino-1,2,4-triazol.

## ABSTRACT

An alternative to combating the irrational use of antimicrobials is antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), a modern and non-invasive form of therapy, which has its mechanism of action based on the activation by irradiation of a photosensitizer (PS) in the presence of oxygen and under specific fluências of light at the appropriate wavelength. The aim of this study is to evaluate possible alterations in the antimicrobial action of PDTa mediated by Methylene Blue (MB) and Curcumin (CUR) in the presence of the catalase inhibitor 3-AT on *S. aureus* ATCC 25923 in planktonic phase. For that, the tests of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were carried out on 3-AT through the microdilution method, the evaluation of the photodegradation of the PS, the standardization of the ideal parameters of aPDT and the evaluation of synergism between aPDT and 3-AT at different inhibition times (10 to 40 minutes). Statistical data analysis was performed using the Analysis of Variance test (one-way or two-way ANOVA) with Tukey's post-test. 3-AT did not show MIC and CBM at the concentrations evaluated and showed a pattern of growth reduction in the presence of the inhibitor, without bacterial death after its withdrawal. The ideal parameters for aPDT mediated by MB solubilized in sterile saline and by CUR dissolved in 1% DMSO and 0.5% sucrose were 10 minutes pre-irradiation, 50 µg/mL MB, 72.96 mW/cm<sup>2</sup>, 65.66 J/cm<sup>2</sup> and 30 minutes pre-irradiation, 6.25 µg/mL CUR, 55 mW/cm<sup>2</sup> and 25 J/cm<sup>2</sup>, respectively. In combined therapy (CT) between aPDT and 3-AT, different catalase inhibition times required for total bacterial reduction were evaluated. Therefore, it can be concluded that CT demonstrated synergism between aPDT and 3-AT, it is dependent on catalase inhibition time and pre-irradiation time of PSs and has great potential for future studies.

**Keywords:** Antimicrobial Photodynamic Therapy. Methylene Blue. Curcumin. Catalase. 3-amino-1,2,4-triazole.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Linha do tempo da introdução de antibióticos na prática clínica e de desenvolvimento de resistência antimicrobiana. ....                                                                            | 17 |
| Figura 2. Esquema do Diagrama de Jablonski para o mecanismo de ação das reações tipo I e II da TFD.....                                                                                                       | 18 |
| Figura 3. Estrutura molecular do Azul de metileno .....                                                                                                                                                       | 20 |
| Figura 4. Tautomerismo da curcumina sob condições fisiológicas. Há predominância da forma bis-ceto (superior) em condições ácidas e neutras; há predomínio da forma enolato (inferior) em pH acima de 8. .... | 22 |
| Figura 5. Porcentagem de colonização de <i>S. aureus</i> por local do corpo em adultos .....                                                                                                                  | 23 |
| Figura 6. Estrutura molecular do 3-amino-1,2,4-triazol.....                                                                                                                                                   | 26 |
| Figura 7. Espectro de absorção de luz do Azul de metileno em TSB. ....                                                                                                                                        | 37 |
| Figura 8. Espectro de absorção de luz da Curcumina em TSB. ....                                                                                                                                               | 38 |
| Figura 9. Espectro de absorção de luz do 3-AT em TSB.....                                                                                                                                                     | 39 |
| Figura 10. Espectros de absorção de luz da fotodegradação do Azul de metileno (6,25 µg/mL) dissolvida salina, com e sem irradiação por LED vermelho.....                                                      | 40 |
| Figura 11. Espectros de absorção de luz da fotodegradação do Azul de metileno (12,5 µg/mL) dissolvida salina, com e sem irradiação por LED vermelho.....                                                      | 41 |
| Figura 12. Espectros de absorção de luz da fotodegradação do Azul de metileno (25 µg/mL) dissolvida salina, com e sem irradiação por LED vermelho.....                                                        | 42 |
| Figura 13. Espectros de absorção de luz da fotodegradação do Azul de metileno (50 µg/mL) dissolvida salina, com e sem irradiação por LED vermelho.....                                                        | 43 |
| Figura 14. Espectros de absorção de luz da fotodegradação do Azul de metileno (100 µg/mL) dissolvida salina, com e sem irradiação por LED vermelho.....                                                       | 44 |
| Figura 15. Espectros de absorção de luz da fotodegradação da Curcumina (6,25 µg/mL) dissolvida em DMSO 1% e sacarose 0,5%, com e sem irradiação por LED azul .....                                            | 47 |
| Figura 16. Espectros de absorção de luz da fotodegradação da Curcumina (12,5 µg/mL) dissolvida em DMSO 1% e sacarose 0,5%, com e sem irradiação por LED azul .....                                            | 48 |
| Figura 17. Espectros de absorção de luz da fotodegradação da Curcumina (25 µg/mL) dissolvida em DMSO 1% e sacarose 0,5%, com e sem irradiação por LED azul .....                                              | 49 |
| Figura 18. Avaliação da toxicidade do 3-AT na suspensão bacteriana de <i>S. aureus</i> após 24 horas de contato.....                                                                                          | 52 |
| Figura 19. Avaliação da toxicidade do Azul de metileno na ausência e após irradiação. ....                                                                                                                    | 53 |
| Figura 20. Avaliação da toxicidade da Curcumina na ausência e presença de irradiação. ....                                                                                                                    | 55 |
| Figura 21. Avaliação da toxicidade do Azul de metileno (50 µg/mL) e do 3-AT (10 µg/mL) na ausência de irradiação. ....                                                                                        | 57 |
| Figura 22. Avaliação susceptibilidade bacteriana em fase planctônica em suspensão de <i>S. aureus</i> empregando a terapia fotodinâmica antimicrobiana combinada mediada                                      |    |

|                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| por Azul de metileno (50 µg/mL) e LED 660 nm com período de inibição da catalase de 10 a 40 minutos.....                                                                                       | 58 |
| Figura 23. Avaliação da toxicidade da Curcumina (6,25 µg/mL) e do 3-AT (10 µg/mL) na ausência e na presença de irradiação, primeiro com a adição do 3-AT seguido da adição da Curcumina .....  | 60 |
| Figura 24. Avaliação da toxicidade da Curcumina (6,25 µg/mL) e do 3-AT (10 µg/mL) na ausência e na presença de irradiação, primeiro com a adição da Curcumina, seguido da adição do 3-AT ..... | 61 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Nível de significância da diferença da absorbância em 660 nm no escuro e após irradiação na fotodegradação do Azul de Metileno ..... | 45 |
| Tabela 2. Taxa de Fotodegradação do Azul de Metileno .....                                                                                     | 45 |
| Tabela 3 Taxa de Degradação da Curcumina no escuro e após irradiação .....                                                                     | 50 |
| Tabela 4. Porcentagem de redução do crescimento bacteriano na presença do 3-AT .....                                                           | 51 |
| Tabela 5. Redução bacteriana pós Terapia Fotodinâmica mediada por Azul de Metileno .....                                                       | 54 |
| Tabela 6. Redução bacteriana pós Terapia Fotodinâmica mediada por Curcumina .....                                                              | 55 |
| Tabela 7. Redução bacteriana pós Terapia Combinada mediada por Azul de Metileno nos diferentes tempos de inibição da catalase.....             | 59 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

|                                           |                                                               |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| <b><math>^1\text{O}_2</math></b>          | Oxigênio singlete                                             |
| <b>3-AT</b>                               | 3-amino-1,2,4-triazol                                         |
| <b>AM</b>                                 | Azul de metileno                                              |
| <b>ANOVA</b>                              | Análise de Variância                                          |
| <b>ATCC</b>                               | <i>American Type Culture Collection</i>                       |
| <b>CAT</b>                                | Catalase                                                      |
| <b>CBM</b>                                | Concentração Bactericida Mínima                               |
| <b>CIM</b>                                | Concentração Inibitória Mínima                                |
| <b>CNPq</b>                               | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| <b>CUR</b>                                | Curcumina                                                     |
| <b>ERO</b>                                | Espécies reativas de oxigênio                                 |
| <b>FIOCRUZ</b>                            | Fundação Oswaldo Cruz                                         |
| <b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math></b>  | Peróxido de hidrogênio                                        |
| <b><math>\text{HO}^\bullet</math></b>     | Radical Hidroxila                                             |
| <b>LED</b>                                | <i>Light Emittig Diodes</i>                                   |
| <b><math>\text{Log}_{10}</math></b>       | Logaritmo na base 10                                          |
| <b>MRSA</b>                               | <i>S. aureus</i> resistente à meticilina                      |
| <b>MSSA</b>                               | <i>S. aureus</i> sensível à meticilina                        |
| <b><math>\text{NO}^\bullet</math></b>     | Óxido nítrico                                                 |
| <b>Ns</b>                                 | Não significativo                                             |
| <b><math>\text{O}_2^{\bullet-}</math></b> | Radical superóxido                                            |
| <b><math>\text{OCl}^-</math></b>          | Ânion hipoclorito                                             |

|                         |                               |
|-------------------------|-------------------------------|
| <b>ONOO<sup>-</sup></b> | Peroxinitrito                 |
| <b>RO<sup>•</sup></b>   | Radical Alcoxila              |
| <b>ROO<sup>•</sup></b>  | Radical Peroxila              |
| <b><i>S. aureus</i></b> | <i>Staphylococcus aureus</i>  |
| <b>SOD</b>              | Superóxido dismutase          |
| <b>TC</b>               | Terapia Combinada             |
| <b>TSA</b>              | <i>Trypctic Soy Agar</i>      |
| <b>TSB</b>              | <i>Trypctic Soy Broth</i>     |
| <b>UFC</b>              | Unidade formadora de colônias |
| <b>UV-Vis</b>           | Ultravioleta-visível          |

# Sumário

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                                            | 16 |
| 1.1. Resistência microbiana à antibióticos                                                                      | 16 |
| 1.2. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa)                                                                 | 18 |
| 1.2.1. Azul de metileno                                                                                         | 20 |
| 1.2.2. Curcumina                                                                                                | 21 |
| 1.3. <i>Staphylococcus aureus</i>                                                                               | 22 |
| 1.4. Catalase                                                                                                   | 24 |
| 1.5. 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT)                                                                               | 25 |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                                                                             | 26 |
| 2.1. Objetivo Geral                                                                                             | 26 |
| 2.2. Objetivos específicos                                                                                      | 27 |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>                                                                                    | 27 |
| 3.1. Materiais de Consumo e Instrumento                                                                         | 27 |
| 3.2. Equipamentos                                                                                               | 27 |
| 3.3. Preparo do inóculo                                                                                         | 28 |
| 3.3.1. Primeira fase                                                                                            | 28 |
| 3.3.2. Segunda fase                                                                                             | 28 |
| 3.4. Fotossensibilizadores e fontes de luz                                                                      | 29 |
| 3.5. Espectro de absorção de luz dos fotossensibilizadores e inibidores                                         | 29 |
| 3.6. Fotodegradação dos fotossensibilizadores                                                                   | 30 |
| 3.7. Avaliação das Concentrações Inibitória Mínima e Bactericida Mínima do inibidor 3-AT sobre <i>S. aureus</i> | 30 |
| 3.7.1. Concentrações Inibitória Mínima (CIM)                                                                    | 30 |
| 3.7.2. Concentrações Bactericida Mínima (CBM)                                                                   | 31 |
| 3.8. Terapia Fotodinâmica                                                                                       | 31 |
| 3.9. Testes de susceptibilidade bacteriana frente à TFD                                                         | 32 |
| 3.10. Grupos experimentais avaliados                                                                            | 32 |
| 3.10.1. Primeira etapa                                                                                          | 32 |
| 3.10.2. Segunda etapa                                                                                           | 34 |
| 3.11. Análise estatística                                                                                       | 36 |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                                | 37 |
| 4.1. Espectro de absorção de luz dos fotossensibilizadores e inibidor de catalase                               | 37 |

|                                                                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2. Fotodegradação dos fotossensibilizadores.....                                                                    | 39        |
| 4.3. Avaliação das Concentrações Inibitória Mínima e Bactericida Mínima do inibidor 3-AT sobre <i>S. aureus</i> ..... | 51        |
| 4.4. Testes de susceptibilidade bacteriana frente à TFD .....                                                         | 53        |
| 4.4.1. Primeira etapa.....                                                                                            | 53        |
| 4.4.2. Segunda etapa.....                                                                                             | 56        |
| <b>5. CONCLUSÕES .....</b>                                                                                            | <b>63</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                              | <b>64</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Resistência microbiana à antibióticos

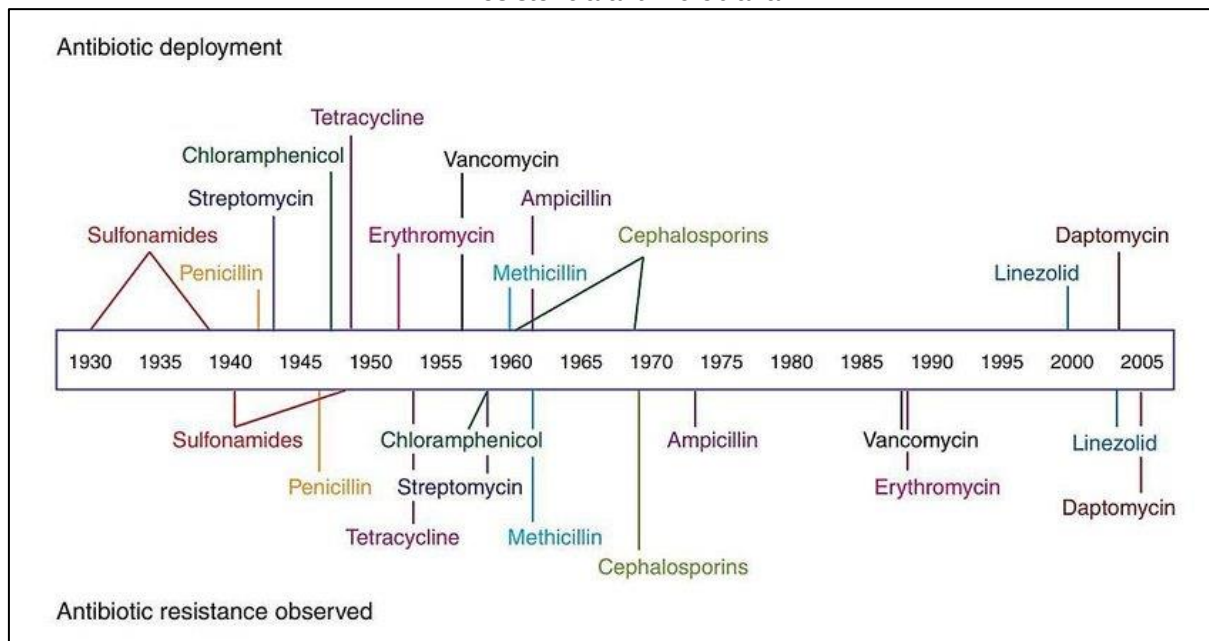
O surgimento da quimioterapia moderna é creditado aos esforços de Paul Ehrlich, na Alemanha, durante a primeira parte do século XX. Enquanto tentava corar bactérias sem corar os tecidos circundantes, ele especulava sobre alguma “bala mágica” que encontraria e destruiria patógenos de forma seletiva, porém sem afetar o hospedeiro. Em 1928, Alexander Fleming observou a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* na área circundante de uma colônia de um bolor que havia contaminado a placa de Petri, o qual foi identificado como *Penicillium notatum*, que teve seu composto ativo posteriormente isolado, a penicilina (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012)

Os antibióticos são tradicionalmente classificados por seu modo de ação, podendo ser bactericidas, como os  $\beta$ -lactâmicos e as quinolonas, ou bacteriostáticos, como as tetraciclinas e o cloranfenicol. Eles agem inibindo diversas funções bacterianas essenciais para o crescimento *in vitro*, como síntese de parede celular, replicação de DNA, transcrição de RNA e síntese de proteínas (RANG et al., 2012)

Embora esteja claro que os antibióticos destinados à viabilidade celular têm sido historicamente altamente eficazes, os modos de ação impõem grande pressão seletiva e promove o crescimento de cepas resistentes à essas drogas (RANG et al., 2012). O desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos é um fenômeno natural como resposta à pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos. Essa pressão seletiva tem sofrido uma expansão acelerada devido à utilização inadequada destes fármacos, sabendo-se que há uma correlação muito clara entre um maior consumo de antibióticos e níveis mais elevados de resistência microbiana (LOUREIRO et al., 2016).

Na figura 1 está representada a linha do tempo dos desenvolvimentos das primeiras classes de antibióticos (lado superior) e o desenvolvimento de resistência para cada classe dessas drogas (lado inferior). É destacado no artigo que a data de aparecimento da resistência ao antibiótico não implica necessariamente que um dado antibiótico tenha perdido toda a utilidade clínica.

Figura 1. Linha do tempo da introdução de antibióticos na prática clínica e de desenvolvimento de resistência antimicrobiana.



A figura demonstra a linha do tempo de implantação de antibióticos e a evolução da resistência a antibióticos. O ano de implantação de cada antibiótico é demonstrado no lado superior da linha do tempo, e o ano em que a resistência a cada antibiótico foi observada é demonstrado no lado inferior da linha do tempo. As autoras destacam que a data de aparecimento da resistência a antibióticos não implica necessariamente que um dado antibiótico tenha perdido toda a utilidade clínica. Fonte: CLATWORTHY; PIERSON; HUNG, 2007.

Devido ao crescimento acelerado da resistência microbiana em frente aos agentes antimicrobianos mais eficazes, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu uma estratégia global chamada "Estratégia Global de Contenção da Resistência Antimicrobiana" para combater tal desafio (OMS, 2001). O objetivo desta estratégia foi reduzir a propagação da resistência antimicrobiana implementando vários planos de ação, incluindo a redução do uso inadequado de antimicrobianos (ALGHADEER et al., 2018).

Dada a diferença atual entre nossa capacidade de desenvolver novos antibióticos e a real necessidade de tais drogas, a ameaça de uma era pós-antibiótica está se aproximando grande no horizonte (CLATWORTHY; PIERSON; HUNG, 2007).

Uma alternativa para o combate ao uso irracional de antimicrobianos é a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa), uma forma não invasiva de terapia, usada no tratamento de diversas condições. Tal tratamento apresenta bons resultados terapêuticos, com possibilidade da aplicação conjunta da TFDa e de outros protocolos terapêuticos (KWIATKOWSKI et al., 2018), sendo vastamente aplicada com sucesso em dermatologia (DE ANNUNZIO et al., 2018; MACKAY, 2022), oncologia

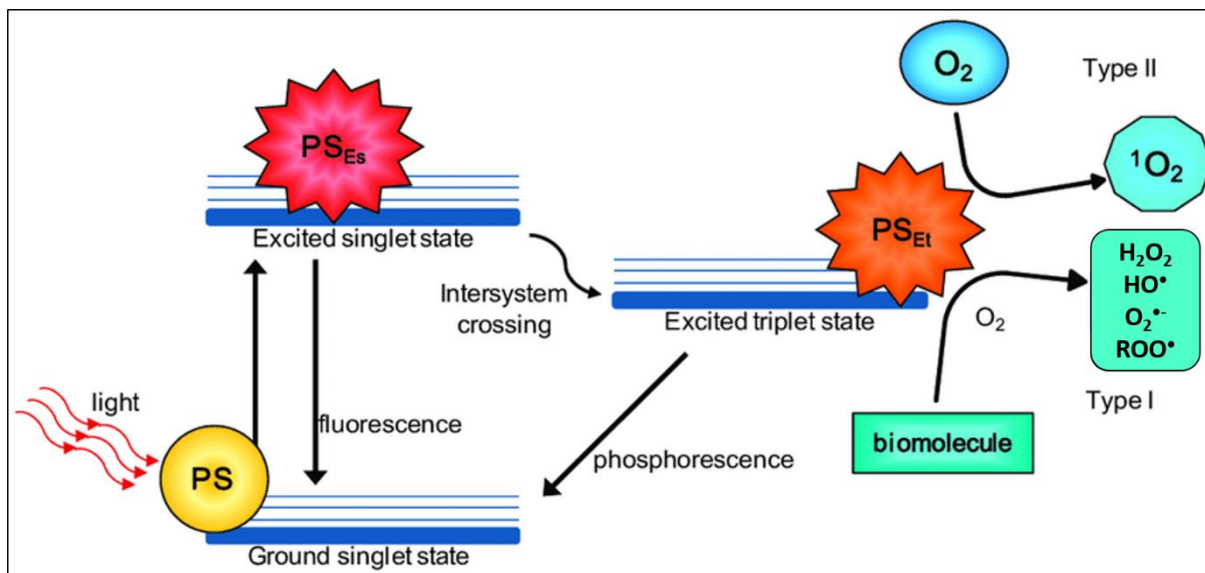
(KARIMNIA; SLACK; CELLI, 2021; YU et al., 2021) e urologia (KUSTOV et al., 2022; TICHACZEK-GOSKA; GLEŃSK; WOJNICZ, 2021).

## **1.2. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa)**

O princípio da TFDa é a aplicação local ou sistêmica de um composto fotossensibilizador (FS), o qual é intensamente acumulado em tecidos alvos. As moléculas do FSs absorvem a luz no comprimento de onda apropriado, iniciando os processos de ativação que levam à destruição seletiva das células inadequadas. A terapia fotodinâmica é bem tolerada pelos pacientes por causa de sua ação seletiva. Protocolos fotodinâmicos são indolores, e a simplicidade de sua aplicação permite o uso ambulatorial (O'NEILL, 2016).

O mecanismo de ação da TFDa (Figura 2) é fundamentado na ativação pela luz do FSs, o qual, na presença de oxigênio e sob irradiação em fluências específicas de luz visível no comprimento de onda adequado, é elevado ao estado excitado e reage com moléculas vizinhas por transferência de energia ou cargas em duas possíveis reações: reação do tipo I e reações do tipo II. Ambos os caminhos podem causar a oxidação de diversos componentes celulares tendo como consequência a morte celular. Na reação do tipo I há produção de radicais livres, como a  $\text{HO}^\bullet$ , reagindo com biomoléculas ou com outros  $\text{HO}^\bullet$ , originando peróxido de hidrogênio, o qual possui efeitos citotóxicos, e lipoperóxido, levando a lipoperoxidação. Na reação do tipo II há transferência de energia ao oxigênio, com indução da produção de  $^1\text{O}_2$ , que leva a oxidação de proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (KWIATKOWSKI et al., 2018).

Figura 2. Esquema do Diagrama de Jablonski para o mecanismo de ação das reações tipo I e II da TFD



Esquema do Diagrama de Jablonski para o mecanismo de ação das reações tipo I e II da TFD. O FS é elevado a um estado singlete excitado após a absorção de luz, decaindo ao estado tripleto excitado após cruzamentos intersistemas. O estado tripleto excitado pode interagir com o oxigênio molecular de forma indireta via transferência de carga por reação com biomoléculas e geração de radicais formando espécies reativas de oxigênio (reação do tipo I) ou de forma direta (reação do tipo II), com formação de  $^1\text{O}_2$ . PS: fotossensibilizador;  $\text{PS}_{\text{Es}}$ : fotossensibilizador no estado singlete excitado;  $\text{PS}_{\text{Et}}$ : fotossensibilizador no estado tripleto excitado;  $^1\text{O}_2$ : oxigênio singlete. Fonte: CALIXTO et al., 2016, adaptado.

O radical livre é um átomo ou molécula que possui um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital externo de maior energia, capazes de existir de forma independente. Por isso, são altamente reativos, instáveis e podem interagir com várias biomoléculas, como lipídeos, proteínas e DNA, dentre outras. Além das espécies radicalares, existem ainda as espécies não radicalares, que embora não possuam elétrons desemparelhados apresentam alta reatividade e podem gerar espécies radicalares na presença de algumas biomoléculas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). As espécies radicalares mais importantes são:  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{HO}^{\bullet}$ ,  $\text{ROO}^{\bullet}$ ,  $\text{RO}^{\bullet}$ ,  $\text{NO}^{\bullet}$ , e as não radicalares são:  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OCl}^-$ ,  $^1\text{O}_2$  e o  $\text{ONOO}^-$  (HALLIWELL, 1993).

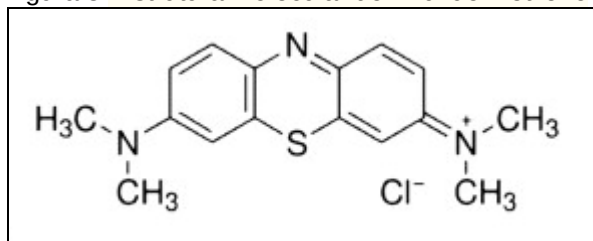
Para combater os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (EROs), existem os sistemas de defesa antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos. As defesas antioxidantes enzimáticas são representadas principalmente pelas enzimas: superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$ ; catalase (CAT) que atua na decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ ; glutathione peroxidase (GSH-Px) atua sobre peróxidos e utiliza o potencial redutor do tripeptídeo glutathione reduzida (GSH) (LIEBERMAN; MARKS, 2013). Já das defesas antioxidantes não enzimáticas, pode-se citar vitamina C, vitamina E e carotenoides (NIMSE; PAL, 2015).

Em relação a fluência utilizada, pode-se dividir em duas categorias de acordo com a redução bacteriana. Fluências que levaram a reduções bacterianas menores que  $3 \log_{10}$  são consideradas sub-ótimas ou sub-letais; já fluências que levaram a reduções bacterianas maiores de  $3 \log_{10}$  são consideradas fluências letais (ALVES et al., 2009; KNAPP; MOODY, 1992; ZAGO et al., 2020).

### 1.2.1. Azul de metileno

O azul de metileno (AM) (figura 3) é uma molécula que contém um sistema central de anel aromático heterocíclico de tiazida (WAINWRIGHT; AMARAL, 2005) que, junto com o grupo imina presente na molécula, permite uma carga positiva deslocalizada em pH neutro, o que explica seu alto potencial de redução e conferem estabilidade ao radical (MOOSMANN et al., 2001; WAINWRIGHT; CROSSLEY, 2002)

Figura 3. Estrutura molecular do Azul de metileno



A figura demonstra a estrutura molecular do Azul de metileno. Fonte: OLIVEIRA et al., 2011.

Tal composto tem a vantagem de possuir baixo custo, apresentar alta pureza e composição estável, estar comercialmente disponível e equilíbrio hidrofílico/lipofílico adequado que permite seu transporte através de membranas celulares e facilita a absorção intracelular (KLOSOWSKI et al., 2020).

Dessa forma, o AM tem sido utilizado na clínica em inúmeros propósitos terapêuticos, como no tratamento da metahemoglobinemia (MANSOURI; LURIE, 1993), malária (ADJALLEY et al., 2011; KRAFTS; HEMPELMANN; SKÓRSKA-STANIA, 2012), envenenamento por monóxido de carbono ou cianeto (HAOUZI et al., 2018) e doenças neurodegenerativas (SCHIRMER et al., 2011).

Na TFDa o AM tem sido utilizado como FS em inúmeras pesquisas e em uma ampla gama de bactérias (DE AGUIAR COLETTI et al., 2017; PARASURAMAN et al., 2019; TOSATO et al., 2020), fungos (CAMPOS et al., 2021; PAZIANI et al., 2019;

TIBURCIO et al., 2022) e parasitas (AURELIANO et al., 2018; CABRAL et al., 2020) devido a sua alta geração de rendimento quântico de  $^1\text{O}_2$  (KLOSOWSKI et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2011), sendo caracterizado como um fotossensibilizador do tipo II, ou seja, tende a realizar a TFDa via reação do tipo II (OLIVEIRA et al., 2011). Esse tipo de reação ocorre via transferência de energia e são mais propensos a preservar o FS, fazendo com que esses tipos de FS sejam mais eficientes para aplicações de TFD do que seus respectivos homólogos tipo I (OLIVEIRA et al., 2011).

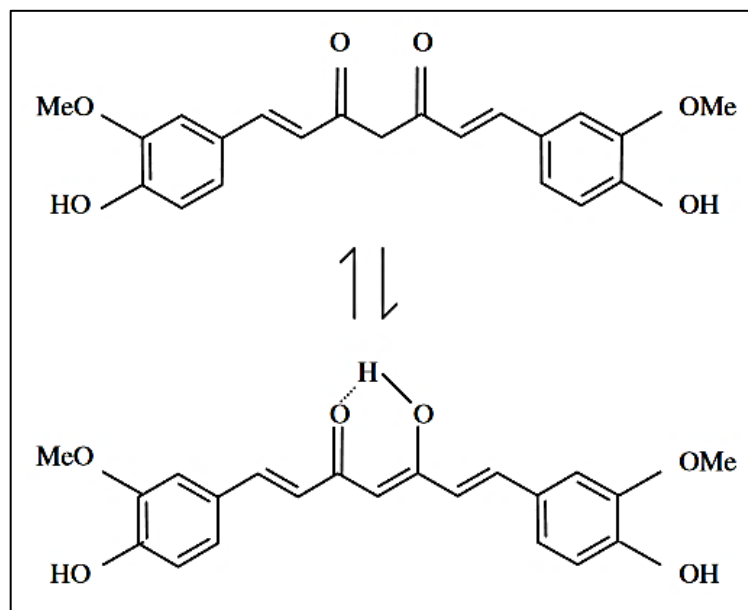
### 1.2.2. Curcumina

Curcumina é um pigmento amarelo extraído do rizoma de *Curcuma longa* L.. (AGGARWAL; KUMAR; BHARTI, 2003; SHARMA; GESCHER; STEWARD, 2005) que tem ações conhecidas como agente anti-inflamatório (PORRO et al., 2019; ZHANG et al., 2022), antioxidante (ABRAHAMS et al., 2019) e anticâncer (BANSAL et al., 2011; SINGH et al., 1998).

É tradicionalmente usada nas medicinas chinesa e indiana devido às suas conhecidas propriedades biológicas e promotoras da saúde (KOLEV et al., 2005), além de ser usada como aditivo alimentar que permite o consumo do composto junto com os alimentos e comprova sua excelente biocompatibilidade (WIKENE; BRUZELL; TØNNESEN, 2015).

A molécula de curcumina (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona) é um bis- $\alpha,\beta,\beta$ -dicetônico que coexiste em equilíbrio com sua forma tautomérica enólica. A forma bis-cetônica é predominante em soluções aquosas ácidas e neutras, além de estar presente na membrana celular; no pH entre 3 e 7, a curcumina atua como um doador de  $\text{H}^+$  muito potente (ARSHAD et al., 2017; SHARMA; GESCHER; STEWARD, 2005). Tal situação é possível na forma cetônica devido à ligação heptadieno entre os anéis de 2-metoxifenol, onde há um carbono altamente ativo; as ligações de hidrogênio deste carbono são muito fracas devido ao desvio da trajetória dos elétrons de oxigênio não emparelhados; já em pH acima de 8 há uma predominância da forma enólica e a molécula é um doador de elétrons (Figura 4) (SHARMA; GESCHER; STEWARD, 2005).

Figura 4. Tautomerismo da curcumina sob condições fisiológicas. Há predominância da forma bis-ceto (superior) em condições ácidas e neutras; há predomínio da forma enolato (inferior) em pH acima de 8.



A figura representa o equilíbrio ceto-enólico da curcumina sob condições fisiológicas. O lado superior da figura representa a estrutura molecular da forma bis-ceto, encontrada em pH ácido e neutro; o lado inferior representa a estrutura molecular da forma enólica, encontrada em pH superior a 8.

A biodisponibilidade da CUR é limitada devido à baixa hidrossolubilidade e alta permeabilidade, fazendo com que a substância seja classificada como uma droga de classe II no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BANSAL et al., 2011; KASIM et al., 2004). Cerca de 60% a 70% de uma dose oral de CUR é eliminada nas fezes devido ao seu rápido metabolismo intestinal e hepático (BANSAL et al., 2011; PAN; HUANG; LIN, 1999).

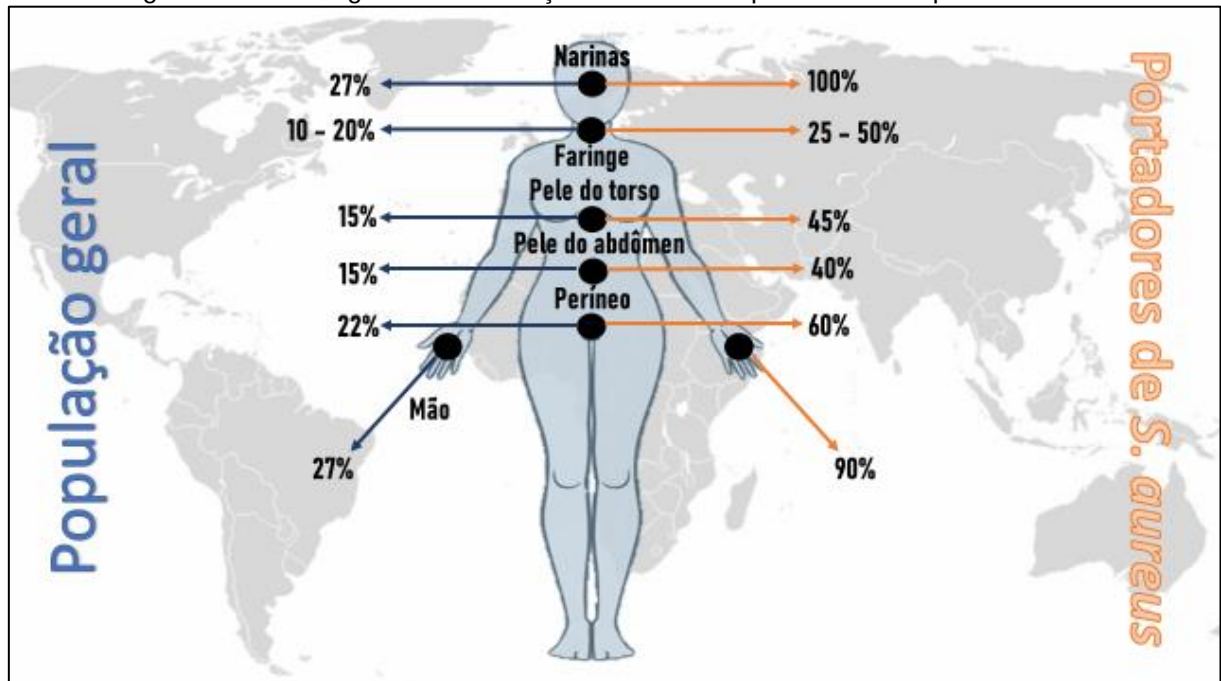
Devido a sua habilidade de absorver na região da luz azul e gerar EROs, essa substância tem sido alvo de atenção de grupos que estudam a TFD (DIAS et al., 2020).

### 1.3. *Staphylococcus aureus*

Aproximadamente 30% da população mundial tem as narinas colonizadas por cepas de *Staphylococcus aureus* (AKHTAR DANESH et al., 2020), cocos Gram-positivos que podem ser encontrados na flora da pele e de membrana de mucosas ou como comensais oportunistas (TONG et al., 2015).

Na literatura há a distinção entre indivíduos portadores ou não de *S. aureus*, com a separação sendo feita através de desenho transversal com uma ou várias culturas nasais (WERTHEIM et al., 2005). Na figura 5 estão representados os principais locais de infecção colonização por *S. aureus* e a diferença em porcentagem da população geral e da população considerada portadora.

Figura 5. Porcentagem de colonização de *S. aureus* por local do corpo em adultos



A figura representa os principais locais de colonização do *S. aureus*, com diferenciação entre a população geral (a esquerda do boneco) e portadores (a direita do boneco). Fonte: adaptado de WERTHEIM et al., 2005.

Essa distinção é importante porque os portadores persistentes, cuja definição varia de estudo para estudo, possuem cargas de *S. aureus* mais altas e maior risco de adquirir infecção por essa bactéria (NOUWEN et al., 2005; WERTHEIM et al., 2005; WHITE, 1963), que pode causar doenças como bacteremia, endocardite, osteomielite, infecções pulmonares, meningite e síndrome do choque tóxico (TONG et al., 2015).

Pesquisas genômicas sugeriram que há a possibilidade de cepas de *S. aureus* terem desenvolvido resistência à metilicina antes mesmo do primeiro uso das penicilinas, fazendo com que a vancomicina seja uma das últimas opções terapêuticas disponíveis para MRSA (WERTHEIM et al., 2005).

Essa resistência pode ser medida pelos genes *mecA*, que pode ser transferido horizontalmente (TURNER et al., 2019), *lukS-PV* e *lukF-PV*, que codificam as subunidades de Leucocidina de Panton-Valentine (PVL), uma toxina capaz de causar

lise em leucócitos (ETIENNE, 2005; MCDUGAL et al., 2003). PVL consiste em 2 proteínas que se combinam como subunidades para formar a leucotoxina que foi associada pela primeira vez à infecção de pele e tecido mole por Panton e Valentine em 1932 (ETIENNE, 2005; REHM; TICE, 2010).

Recentes estudos *in vitro* demonstraram que o *S. aureus* pode invadir várias células fagocíticas não profissionais, incluindo queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e epiteliais, enterócitos e osteoblastos (BAYLES et al., 1998; FOWLER et al., 2000; HESS et al., 2003; MENZIES; KOURTEVA, 1998; NAIR et al., 2003; NUZZO et al., 2000; PEACOCK et al., 1999).

A absorção bacteriana é promovida pela fibronectina que atua como uma molécula de ponte entre a integrina  $\alpha 5\beta 1$  na superfície celular e as proteína fibronectina bacterianas (DZIEWANOWSKA et al., 1999; FOWLER et al., 2000; NAIR et al., 2003; SINHA et al., 1999), ativando a família de tirosina quinases Src e estimulando a internalização da bactéria pelo 'mecanismo de zíper' (AGERER et al., 2005; FOWLER et al., 2003; LOWY et al., 1988). As bactérias internalizadas podem ficar em vacúolos endossomais ou são desviadas da via endossomal para autofagossomos, dependendo do tipo celular invadido e/ou da cepa *S. aureus* (SCHNAITH et al., 2007). Quando a bactéria escapa para o citoplasma, mata a célula hospedeira através da indução de apoptose (BAYLES et al., 1998; DA SILVA et al., 2004; JONAS et al., 1994; MENZIES; KOURTEVA, 1998; NUZZO et al., 2000).

#### **1.4. Catalase**

Catalase (EC 1.11.1.6) (CAT) é uma enzima tetramérica com vários grupos heme na estrutura e peso molecular por volta 225 – 270 kDa. Tem como função a decomposição da  $H_2O_2$  em água e oxigênio pela transferência de dois elétrons (FITA; ROSSMANN, 1985; NADLER; GOLDBERG; HOCHMAN, 1986), acreditando-se a ela uma composição no segundo nível de defesa contra EROs (SEPASI TEHRANI; MOOSAVI-MOVAHEDI, 2018).

A CAT ocorre em quase todos os organismos aeróbios, e foi uma das primeiras enzimas isolada com alto estado de pureza (FITA; ROSSMANN, 1985). Bactérias expressam dois tipos de CAT, as monofuncionais e as catalase-peroxidase, sendo

essa última exclusivas de bactérias e alguns fungos (NADLER; GOLDBERG; HOCHMAN, 1986).

Das bactérias CAT positivas, podemos citar *S. aureus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter fetus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Entretanto, de maio a agosto de 2002, no Brasil, foram isolado 11 cepas de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), CAT negativo e susceptíveis somente à vancomicina e linezolida de quatro paciente da unidade intensiva de tratamento (UTI) (DEL'ALAMO et al., 2007), o que demonstra a capacidade de adaptação e motivo de preocupação com essa bactéria.

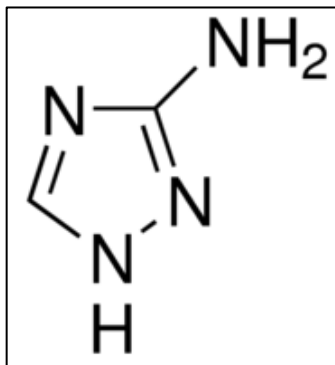
Pensando-se na atividade realizada pela CAT de transformar o  $H_2O_2$  em produtos menos tóxicos e que o  $H_2O_2$  é um dos componentes resultantes da TFDa, foi teorizado se a atividade antioxidante da CAT não diminui a efetividade da TFDa e, além disso, se a inibição dessa enzima não levaria a uma diminuição da degradação do  $H_2O_2$ , fazendo com que se tenha um maior efeito citotóxico da TFDa. Para a inibição enzimática da catalase foi utilizado o 3-amino-1,2,4-triazol.

### **1.5.3-amino-1,2,4-triazol (3-AT)**

Os triazóis são substâncias hetero-aromáticas que apresentando seis elétrons do subnível *p*, sendo que aqueles que não apresentam substituintes no átomo de nitrogênio podem se apresentar como três estruturas tautoméricas (MELO et al., 2006).

O 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) (Figura 6) faz parte da classe dos triazóis e tem como função a inibição da atividade da catalase pela ligação covalente ao centro ativo da forma tetramérica ativa contendo grupos heme (CHANG; SCHROEDER, 1972; MARGOLIASH; NOVOGRODSKY, 1958; MARGOLIASH; NOVOGRODSKY; SCHEJTER, 1960; MELO et al., 2006; SUN et al., 2018; UEDA et al., 2003).

Figura 6. Estrutura molecular do 3-amino-1,2,4-triazol



A figura demonstra a estrutura molecular do 3-amino-1,2,4-triazol. Fonte: KAUR et al., 2016.

A busca na literatura por estudos que aplicavam o 3-AT em bactérias não gerou resultados. Entretanto, o 3-AT é bastante aplicado em linhagens celulares devido a sua capacidade de supressão da catalase.

Além da capacidade de supressão da catalase, acredita-se que o 3-AT consiga realizar uma leve e temporária supressão da atividade da peroxidase, levando-se a crer que o composto não possua toxicidade e, possivelmente, não cause reações adversas (HEIM; APPLEMAN; PYFROM, 1956).

Na literatura é possível encontrar muitos relatos do uso do 3-AT em ensaios de quantificação da catalase, todos usando amostra de tecido animal ou humano (BANERJEE et al., 2018; MILTON, 2001; SINGH; SINGH, 2019; VAN ONSELEN; DOWNING, 2019), e no combate ao câncer (CARRAHER JR et al., 2019; SUN et al., 2018), mas pouca aplicação em microrganismos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar a ação antimicrobiana da TFD mediada por Azul de metileno e por Curcumina na presença do inibidor de catalase sobre *S. aureus* ATCC® 25923™ em fase planctônica.

## 2.2. Objetivos específicos

- Investigar existência de concentrações bactericida mínima (CBM) e inibitória mínima (CIM) do inibidor de catalase sobre suspensão de *S. aureus*;
- Otimizar o tempo de pré-incubação dos FSs e do inibidor de catalase para inativação das enzimas;
- Avaliar viabilidade bacteriana por contagem de unidades formadores de colônias (UFC/mL) de cada modalidade terapêutica.
- Comparar a eficácia da terapia combinada em dois comprimentos de onda (460 e 660 nm)

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

Na fase experimental deste estudo foram utilizados os materiais de consumo, instrumental e equipamentos listados nos próximos tópicos.

### 3.1. Materiais de Consumo e Instrumento

- 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Azul de metileno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Cepa padrão de *S. aureus* (ATCC 25923) (Fiocruz, Manguinhos, RJ, Brasil)
- Cloreto de Sódio P.A. (Neon, Suzano, SP, Brasil)
- Curcumina (Laboratório de Química Bioorgânica, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil)
- Dimetilsulfóxido (DMSO), pureza  $\geq 99,9\%$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Meio de cultura caldo *Trypctic Soy Broth* (TSB - Kasvi, Curitiba, PR, Brasil)
- Meio de cultura *Trypctic Soy Agar* (TSA - Kasvi, Curitiba, PR, Brasil)
- Sacarose P.A. (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Meio de cultura *Mueller Hinton Agar* (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil)
- Meio de cultura *Mueller Hinton Broth* (HiMedia Laboratories, Mumbai, Índia)

### 3.2. Equipamentos

- Aparelho de luz LED, 450 nm (IrradLED® – biopdi, São Carlos, SP, Brasil)

- Aparelho de luz LED, 660 nm (IrradLED® – biopdi, São Carlos, SP, Brasil)
- Espectrofotômetro (Biotek, Winooski, VT, USA)
- Synergy H1M (Synergy H1 Multi-Mode Reader, Biotek, Winooski, VT, USA)

### 3.3. Preparo do inóculo

#### 3.3.1. Primeira fase

Foi realizado um screening avaliando diferentes concentração da CUR e do AM para definição de parâmetros subletais.

A cepa padrão de *S. aureus* (ATCC® 25923™) sensível à metilicina foi semeada via método de esgotamento em TSA e incubada a 37°C em estufa de aerobiose por 24 horas. Após esse período, com auxílio de alça estéril, de 5 a 7 colônias foram inoculadas em 5 mL de caldo TSB, com posterior incubação a 37°C em estufa de aerobiose por 18 horas.

Desse inóculo foi feita uma diluição 1:10 em caldo TSB, a qual foi incubada a 37°C em estufa de aerobiose por 4 horas, sendo feita a medida da densidade óptica em 630nm (D.O.<sub>630nm</sub>) espectrofotômetro. Para tal medida foi utilizado 100 µL do inóculo e a D.O.<sub>630nm</sub> ajustada entre 0,08 e 0,1, o equivalente ao tubo 0,5 na escala turbidimétrica de *McFarland*. Por fim, foi feito uma diluição 1:100 em caldo TSB.

#### 3.3.2. Segunda fase

Foi feito uma otimização dos tempos de inibição utilizando os parâmetros definidos na etapa anterior. Essa fase se inicia contém todos os passos da primeira fase, até o ajuste da D.O.<sub>630nm</sub> e segue com os passos específicos da terapia combinada.

Para os testes de terapia combinada (TC) primeiro com a adição do 3-AT e depois adição do FS foram preparados três inóculos, (1) contendo somente TSB e *S. aureus* em uma diluição 1:100, (2) contendo TSB e *S. aureus* a 1:100 e 3-AT 20 µg/mL diluído em salina estéril e (3) contendo TSB e *S. aureus* a 1:200 e 3-AT 10 µg/mL diluído em salina estéril.

Para os testes de TC primeiro com a adição da CUR e depois adição do 3-AT foram feitas duas diluições do inóculo em TSB (1:50 e 1:100).

Os inóculos foram deixados em contato com o 3-AT por 10, 20, 30 e 40 minutos.

### **3.4. Fotossensibilizadores e fontes de luz**

Os fotossensibilizadores utilizados neste estudo foram Azul de Metileno (AM) e Curcumina (CUR). As concentrações avaliadas dos FS foram 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL (RONQUI et al., 2016). As soluções de FS foram feitas em microtubos envoltos em papel alumínio para impedir a exposição do FS à luz durante o preparo do experimento.

O AM foi obtido da empresa Sigma (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA) e solubilizada em salina estéril. O tempo de pré-incubação do inóculo com as soluções do FS foi de 10 minutos, em temperatura ambiente e no escuro. A fluência de luz empregada no ensaio foi 65,66 J/cm<sup>2</sup> (79,96 mW/cm<sup>2</sup>) (RAPACKA-ZDONCZYK et al., 2019).

A CUR foi sintetizada pelo grupo de pesquisa do Dr. Kleber Thiago de Oliveira, professor do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos – SP (UFSCar). A CUR foi inicialmente solubilizada em DMSO 100%, seguido de diluição em sacarose 1% até que o DMSO fosse diluído à 1% e a sacarose a 0,5%. O tempo de pré-incubação do inóculo com as soluções do FS foi de 30 minutos, em temperatura ambiente e no escuro (GERALDE et al., 2013). A fluência de luz empregada para a realização dos ensaios foi 25 J/cm<sup>2</sup> (55 mW/cm<sup>2</sup>) (DE ANNUNZIO et al., 2018).

Devidos aos respectivos espectros de absorção, a fonte de luz utilizada para irradiar o AM foi um sistema LED vermelho no comprimento de onda de 660nm e para a CUR foi um sistema LED azul no comprimento de onda de 450nm. O modo de irradiação empregado foi o fracionado, ou seja, a cada 60 segundos a irradiação cessava durante 30 segundos.

### **3.5. Espectro de absorção de luz dos fotossensibilizadores e inibidores**

Uma alíquota de 100 µL das soluções de AM, CUR ou 3-AT foi adicionada em um poço da placa de 96 poços e uma alíquota de 100 µL do branco foi adicionada a um poço diferente, tendo a leitura realizada logo em seguida.

### 3.6. Fotodegradação dos fotossensibilizadores

O teste visa avaliar o decaimento da absorbância do FS de acordo com o tempo de irradiação. Para isso uma alíquota de 100 µL das soluções de AM ou CUR foi adicionada em um poço da placa de 96 poços e uma alíquota de 100 µL do branco foi adicionada a um poço diferente. As alíquotas foram submetidas à 1/3, 2/3 e o tempo total de irradiação dos parâmetros utilizados para cada FS e a leitura do espectro de absorção de luz foi realizada logo em seguida.

A porcentagem de fotodegradação dos FSs foi calculada de acordo com SAEED et al (2015) pela equação I.

$$\% \text{ Fotodegradação} = \left( \frac{A_0 - A}{A_0} \right) \times 100 \quad (I)$$

Onde “A<sub>0</sub>” representa a absorbância da solução sem irradiação e “A” representa a absorbância da solução após a irradiação total.

### 3.7. Avaliação das Concentrações Inibitória Mínima e Bactericida Mínima do inibidor 3-AT sobre *S. aureus*

#### 3.7.1. Concentrações Inibitória Mínima (CIM)

O ensaio foi feito de acordo com de acordo com as diretrizes documento M07-A9 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012).

O método de crescimento bacteriano utilizado foi o descrito na seção 8.2.2 do documento M07-A9, que indica que três a cinco colônias bem isoladas e de mesmas morfologias devem ser selecionadas de uma cultura em ágar sólido e inoculadas com swab estéril em 4 a 5 mL de TSB. O inóculo foi incubado até D.O.<sub>630nm</sub> 0,08 - 0,1 (o equivalente a 0,5 McFarland) e diluído a 1:100 em TSB.

O teste foi realizado em microdiluição na placa de 96 poços. Nos poços testes foram adicionados 100 µL de caldo Mueller-Hinton (MH), 100 µL de 3-AT no dobro da concentração testada e 10 µL de inóculo bacteriano, no poço de controle negativo foi adicionado 110 µL de caldo MH e 100 µL de 3-AT no dobro da concentração testada; no poço de controle positivo foram adicionados 200 µL de caldo MH e 10 µL de inóculo

bacteriano. As placas foram incubadas a 35°C por 16-20h e as absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro,

As concentrações de 3-AT testadas variaram de 10 a 60 µL/mL.

A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com GUDIÑA et al. (2010) pela equação II.

$$\% \text{ Inibição} = \left(1 - \left(\frac{A_c}{A_0}\right)\right) \times 100 \quad (\text{II})$$

Onde “Ac” representa a médias das absorvâncias do teste menos a média das absorvâncias do controle negativo e “A<sub>0</sub>” a médias das absorvâncias do controle positivo.

### **3.7.2. Concentrações Bactericida Mínima (CBM)**

O ensaio de CBM foi uma continuação do ensaio de MIC, uma vez que os poços resultantes da incubação a 35°C por 16 - 20h foram diluídos em TSB e plaqueados em TSA. As placas foram incubadas a 37°C por 24h e foi feita a contagem de colônias após o período.

### **3.8. Terapia Fotodinâmica**

A placa de 96 poços foi irradiada de forma que a luz cobrisse toda a extensão dos poços. O formato de feixe gerado por este sistema permite uma irradiação pontual pelo spot uniformemente circular formado. De acordo com a potência de cada LED, com as dimensões do campo de irradiação e com o tempo de exposição da luz, foi então definida a fluência (densidades de energia ou fluência de luz) empregada. O cálculo da fluência de luz foi feito pela equação III.

$$\text{Fluência de luz} \left(\frac{\text{J}}{\text{cm}^2}\right) = I \left(\frac{\text{W}}{\text{cm}^2}\right) \cdot t \text{ (seg)} \quad (\text{III})$$

Onde “I” representa a taxa de fluência de luz e “t” o tempo de irradiação

Como forma de evitar qualquer tipo de interferência durante a irradiação, cada placa recebeu apenas um tipo de tratamento.

### 3.9. Testes de susceptibilidade bacteriana frente à TFD

Após o preparo do inóculo bacteriano, foram realizados os devidos tratamentos requeridos para cada grupo experimental avaliado, resultando em um volume final de 100 µL em cada poço da placa de 96 poços e nas diluições, tanto das soluções quanto do inóculo, em 50%, fazendo com que se tenha uma concentração final de células em aproximadamente  $5 \times 10^7$ .

Terminado os tratamentos, as suspensões bacterianas foram diluídas de forma seriada na base 10 até que a concentração fosse aproximadamente  $10^{-4}$  células/mL. Um volume de 4 µL de cada suspensão foi semeado em triplicata em placa com meio TSA e incubado a 37°C por 24 horas, contando as colônias formadas após o período.

A contagem de colônias foi transformada em unidade formadoras de colônias (UFC)/mL pela equação IV.

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{Número de colônias} \times 10^n}{q} \quad \text{(IV)}$$

Onde  $n$  representa o valor absoluto da diluição e  $q$  a quantidade pipetada em mL a ser semeada na placa contendo o meio sólido.

### 3.10. Grupos experimentais avaliados

#### 3.10.1. Primeira etapa

Nessa etapa foi realizado um *screening* avaliando diferentes concentração do FS e fluências de luz utilizado CUR e AM para definição de parâmetros subletais.

##### • Grupo Controle de Crescimento (CC)

Neste grupo não foi aplicado nenhum tratamento. Aliquotas de 50 µL da suspensão celular de *S. aureus* foram transferidas para um dos poços de uma placa de titulação de 96 poços. A seguir o mesmo volume de caldo TSB estéril foi transferido para o poço e a amostra permaneceu em repouso sem ser exposta à luz durante os tempos de incubação desejados.

- **Grupo Luz (L+FS-)**

Neste grupo foi avaliado se a aplicação da luz na ausência do FS poderia apresentar efeitos tóxicos para *S. aureus*. Dessa forma, alíquotas de 50 µL da suspensão bacteriana foram transferidas para um dos poços de uma placa de 96 poços. A seguir, alíquotas de 50 µL de caldo TSB foram transferidas para o poço, sendo mantida durante o tempo de pré-irradiação determinado no escuro e posteriormente irradiado com as fluências de luz desejadas.

- **Grupo Fotossensibilizador (L-FS+)**

Para avaliação da toxicidade no escuro do FS sobre a suspensão celular, alíquotas de 50 µL da suspensão celular de *S. aureus* e 50 µL do FS no dobro da concentração desejada foram transferidas para poços de uma placa de 96 poços e mantidas no escuro pelo tempo de pré-irradiação e irradiação.

- **Grupo Terapia Fotodinâmica (L+FS+)**

Tal grupo visou avaliar a ação da TFDa mediada pelos FS sobre a suspensão de *S. aureus*. 50µL da suspensão bacteriana e 50 µL do FS no dobro da concentração desejada foram adicionadas aos poços e, após o tempo de pré-incubação de cada FS, a placa foi irradiada.

- **Grupo controle de veículo com DMSO 1% e sacarose 0,5% no escuro (CV DMSO+ SAC+ L-)**

Exclusivo para a CUR, o grupo visou avaliar se o DMSO a 1% e a sacarose a 0,5% (concentrações finais dos solventes durante os ensaios) apresentaram toxicidade no escuro para *S. aureus*. Os ensaios foram realizados adicionando 50 µL de caldo TSB contendo o DMSO a 2% e sacarose a 1% e 50 µL da suspensão bacteriana em um poço de placa de 96 poços e posteriormente foi adicionado ao mesmo poço e mantido no escuro pelos tempos de pré-incubação e irradiação.

- **Grupo controle de veículo com DMSO 1% (CV DMSO+ L+)**

Tal grupo foi aplicado somente para a CUR e avaliou se o DMSO a 1% e a sacarose a 0,5% (concentrações finais dos solventes durante os ensaios) apresentaram toxicidade para *S. aureus*. Os ensaios foram realizados adicionando 50 µL de caldo TSB contendo o DMSO a 2% e sacarose a 1% e 50 µL da suspensão bacteriana em um poço de placa de 96 poços e posteriormente foi adicionado ao mesmo poço, mantida no escuro pelo tempo de pré-incubação, seguido de irradiação da placa.

### **3.10.2. Segunda etapa**

Nessa etapa foi feito uma otimização dos tempos de inibição utilizando os parâmetros definidos na etapa anterior. As avaliações desta etapa utilizaram os mesmos grupos de estudos, com a adição de dois grupos de Terapia Fotodinâmica Combinada.

- **Grupo Controle de Crescimento (CC)**

Neste grupo não foi aplicado nenhum tratamento. Alíquotas de 50 µL do inóculo (1) (TSB e *S. aureus* em diluição 1:100) foram transferidas para um dos poços de uma placa de 96 poços. A seguir o mesmo volume de caldo TSB estéril foi transferido para o poço e a amostra permaneceu em repouso sem ser exposta à luz durante os tempos de incubação desejados.

- **Grupo Luz (L+FS-)**

Neste grupo foi avaliado se a aplicação da luz na ausência do FS poderia apresentar efeitos tóxicos para *S. aureus*. Dessa forma, alíquotas de 50 µL do inóculo (1) (TSB e *S. aureus* em diluição 1:100) foram transferidas para um dos poços de uma placa de 96 poços. A seguir, alíquotas de 50 µL de caldo TSB foram transferidas para o poço, sendo mantida durante o tempo de pré-irradiação determinado no escuro e posteriormente irradiado com as fluências de luz desejadas.

- **Grupo Fotossensibilizador (L-FS+)**

Para avaliação da toxicidade no escuro do FS sobre a suspensão celular, alíquotas de 50 µL do inóculo (1) (TSB e *S. aureus* em diluição 1:100) e 50 µL do FS no dobro da concentração desejada foram transferidas para poços de uma placa de 96 poços e mantidas no escuro pelo tempo de pré-irradiação e irradiação.

**• Grupo Terapia Fotodinâmica (L+FS+)**

Tal grupo visou avaliar a ação da TFDa mediada pelos FS sobre a suspensão de *S. aureus*. 50 µL do inóculo (1) (TSB e *S. aureus* em diluição 1:100) e 50 µL do FS no dobro da concentração desejada foram adicionadas aos poços e, após o tempo de pré-incubação de cada FS, a placa foi irradiada.

**• Grupo controle de veículo com DMSO 1% e sacarose 0,5% no escuro (CV DMSO+ SAC+ L-)**

Exclusivo para a CUR, o grupo visou avaliar se o DMSO a 1% e a sacarose a 0,5% (concentrações finais dos solventes durante os ensaios) apresentaram toxicidade no escuro para *S. aureus*. Os ensaios foram realizados adicionando 50 µL de caldo TSB contendo o DMSO a 2% e sacarose a 1% e 50 µL do inóculo (1) (TSB e *S. aureus* em diluição 1:100) em um poço de placa de 96 poços e posteriormente foi adicionado ao mesmo poço e mantido no escuro pelos tempos de pré-incubação e irradiação.

**• Grupo controle de veículo com DMSO 1% e sacarose 0,5% (CV DMSO+ SAC+ L+)**

Tal grupo foi aplicado somente para a CUR e avaliou se o DMSO a 1% e a sacarose a 0,5% (concentrações finais dos solventes durante os ensaios) apresentaram toxicidade para *S. aureus*. Os ensaios foram realizados adicionando 50 µL de caldo TSB contendo o DMSO a 2% e sacarose a 1% e 50 µL do inóculo (1) (TSB e *S. aureus* em diluição 1:100) em um poço de placa de 96 poços e posteriormente foi adicionado ao mesmo poço, mantida no escuro pelo tempo de pré-incubação, seguido de irradiação da placa.

#### • Grupo Inibidor no escuro (I+ L-)

Esse grupo possuía o objetivo de avaliar a toxicidade no escuro do 3-AT sobre o *S. aureus*. Alíquotas de 100 µL do inóculo (3) (TSB e *S. aureus* em diluição 1:200 e 3-AT 10 µg/mL) foram adicionadas em poços de placa de 96 poços, que foi mantido no escuro pelos tempos de pré-incubação e irradiação.

#### • Grupo Inibidor (I+ L+)

O grupo avaliou a toxicidade pós irradiação do 3-AT sobre o *S. aureus*. Alíquotas de 100 µL do inóculo (3) (TSB e *S. aureus* em diluição 1:200 e 3-AT 10 µg/mL) foram adicionadas em poços de placa de 96 poços, que foi mantida no escuro pelo tempo de pré-incubação, seguido de irradiação da placa.

#### • Grupo Inibidor e FS no escuro (L-FS+I+)

Tal grupo avaliou se o inibidor e o FS possuíam toxicidade no escuro. Em um poço da placa de 96 poços foi adicionado 50 µL do inóculo (2) (TSB e *S. aureus* a 1:100 e 3-AT 20 µg/mL) e 50 µL do FS, sendo mantida no escuro pelo tempo de pré-incubação e irradiação.

#### • Grupo Terapia Fotodinâmica Combinada (L+FS+I+)

O grupo avaliou a ação da TDFa mediada por AM e CUR na presença de 3-AT. Em um poço da placa de 96 poços foi adicionado 50 µL do inóculo (2) (TSB e *S. aureus* a 1:100 e 3-AT 20 µg/mL), mantida no escuro pelo tempo de pré-incubação e, em seguida, irradiada.

### 3.11. Análise estatística

Para comparar os valores das variáveis contínuas entre os grupos foi utilizado teste de Análise de Variância (one-way ANOVA ou two-way ANOVA), com pós-teste de Tukey. As análises foram realizadas através do software Graph Pad Prism® Version

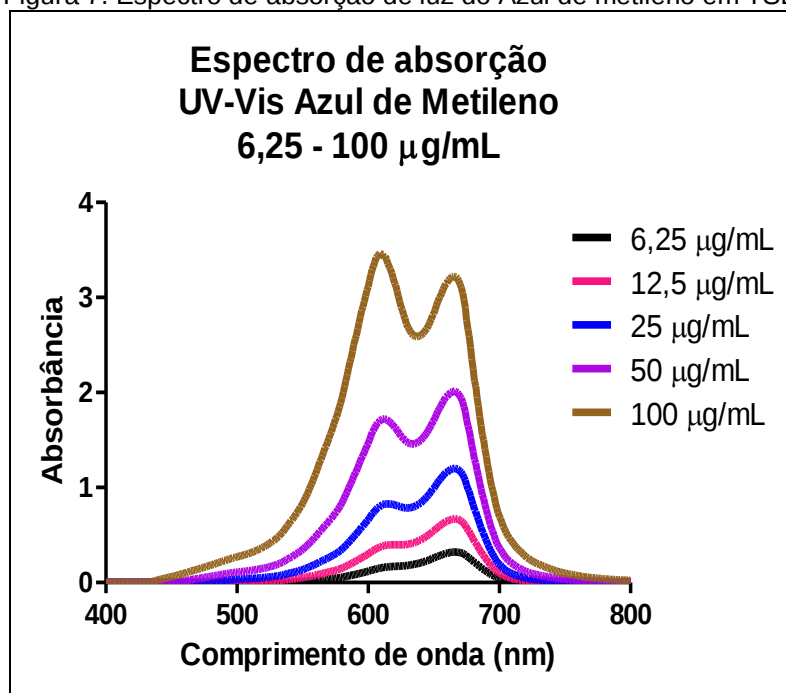
5.01 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 95%, ou seja,  $p < 0.05$ . O Coeficiente de Variação máximo aceitável dos ensaios foi estipulado em 25%.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Espectro de absorção de luz dos fotossensibilizadores e inibidor de catalase

O espectro de absorção UV-Vis de 400 a 800 nm do AM (Figura 7) demonstrou picos de absorbância na região de 600 nm e de 660 nm.

Figura 7. Espectro de absorção de luz do Azul de metileno em TSB.



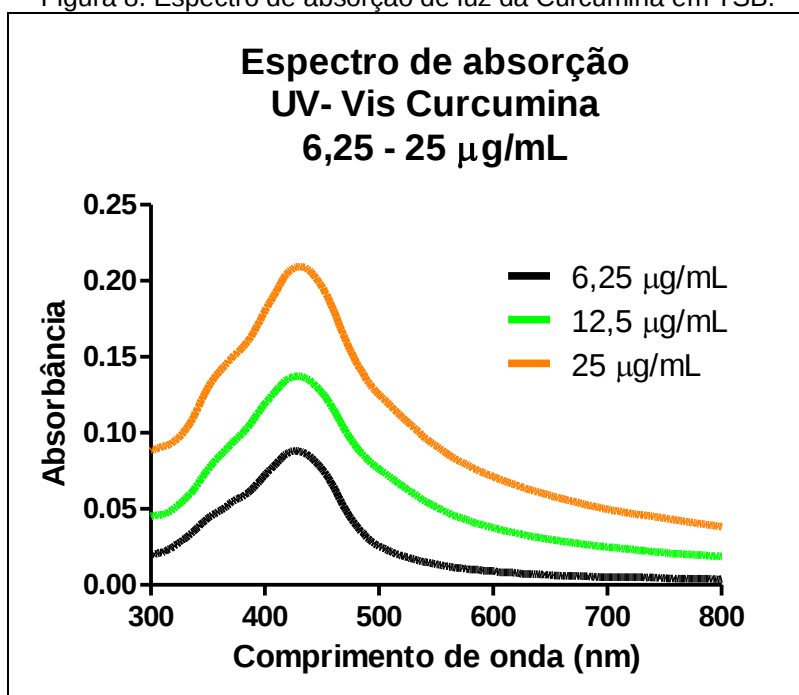
O gráfico representa o espectro de absorbância do Azul de metileno (6,25 – 100 µg/mL) em TSB, de 400 a 800 nm. Fonte: Autoria própria, 2021.

Acredita-se que a natureza planar da molécula de AM possibilita a agregação tanto na fórmula de monômeros quanto de dímeros, a depender do meio e da concentração que a solução se encontra. O tipo de agregação é demonstrado nos picos de absorção, sendo que o da região de 600 nm é resultado de agregados de dímeros e o da região de 660 nm é resultado de agregados de monômeros (DA COLLINA et al., 2018; TORTAMANO et al., 2020).

A alteração de proporção de monômeros e dímeros leva a diminuição significativa da produção de  $^1\text{O}_2$  (DEAN et al., 2016) e alteração da eficiência da TFDa, por consequência.

Em relação à CUR, o espectro de absorção de luz de 300 a 800 nm (figura 8) demonstrou pico máximo de absorção de luz em 460 nm para as soluções utilizadas no estudo. É possível encontrar diferenças espectrais na literatura, pois já foi confirmado que a natureza do solvente utilizado na solução de CUR afeta o espectro de absorção, mesmo que levemente (BONG, 2000; CHIGNELL et al., 1994).

Figura 8. Espectro de absorção de luz da Curcumina em TSB.

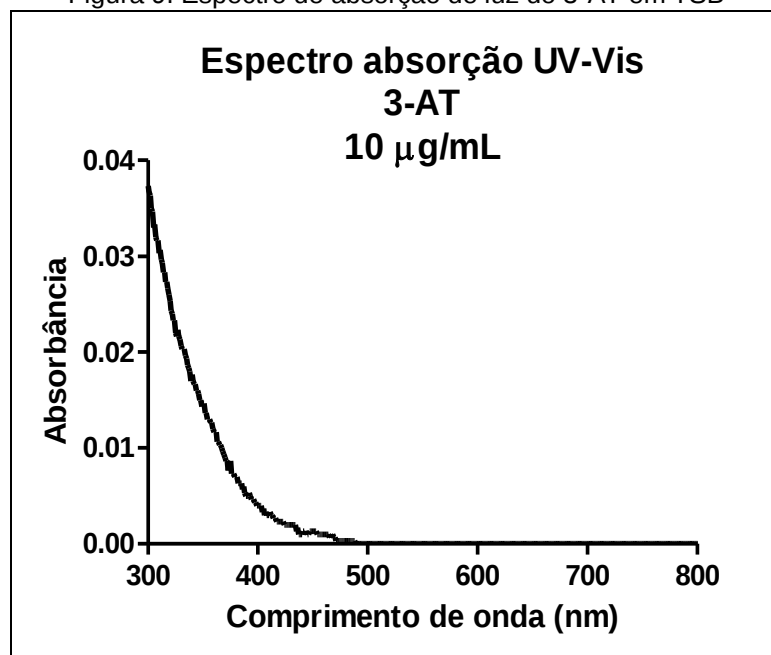


O gráfico representa o espectro de absorbância da Curcumina (6,25 – 25 µg/mL) em TSB, de 300 a 800 nm. Fonte: Autoria própria, 2021.

Outra possível alteração espectral é o aparecimento de bandas dos produtos de fotodegradação, como vanilina e ácido ferúlico, que afetam o efeito biológico da CUR, pois esses produtos não demonstraram atividade biológica até o momento (KHURANA; HO, 1988).

A análise do espectral de absorção de luz de 300 a 800 nm do 3-AT 10 µg/mL (figura 9) não apresentou bandas de absorção de luz.

Figura 9. Espectro de absorção de luz do 3-AT em TSB



O gráfico representa o espectro de absorbância do 3-AT (10 µg/mL) em TSB, de 300 a 500 nm. Fonte: Autoria própria, 2021.

#### 4.2. Fotodegradação dos fotossensibilizadores

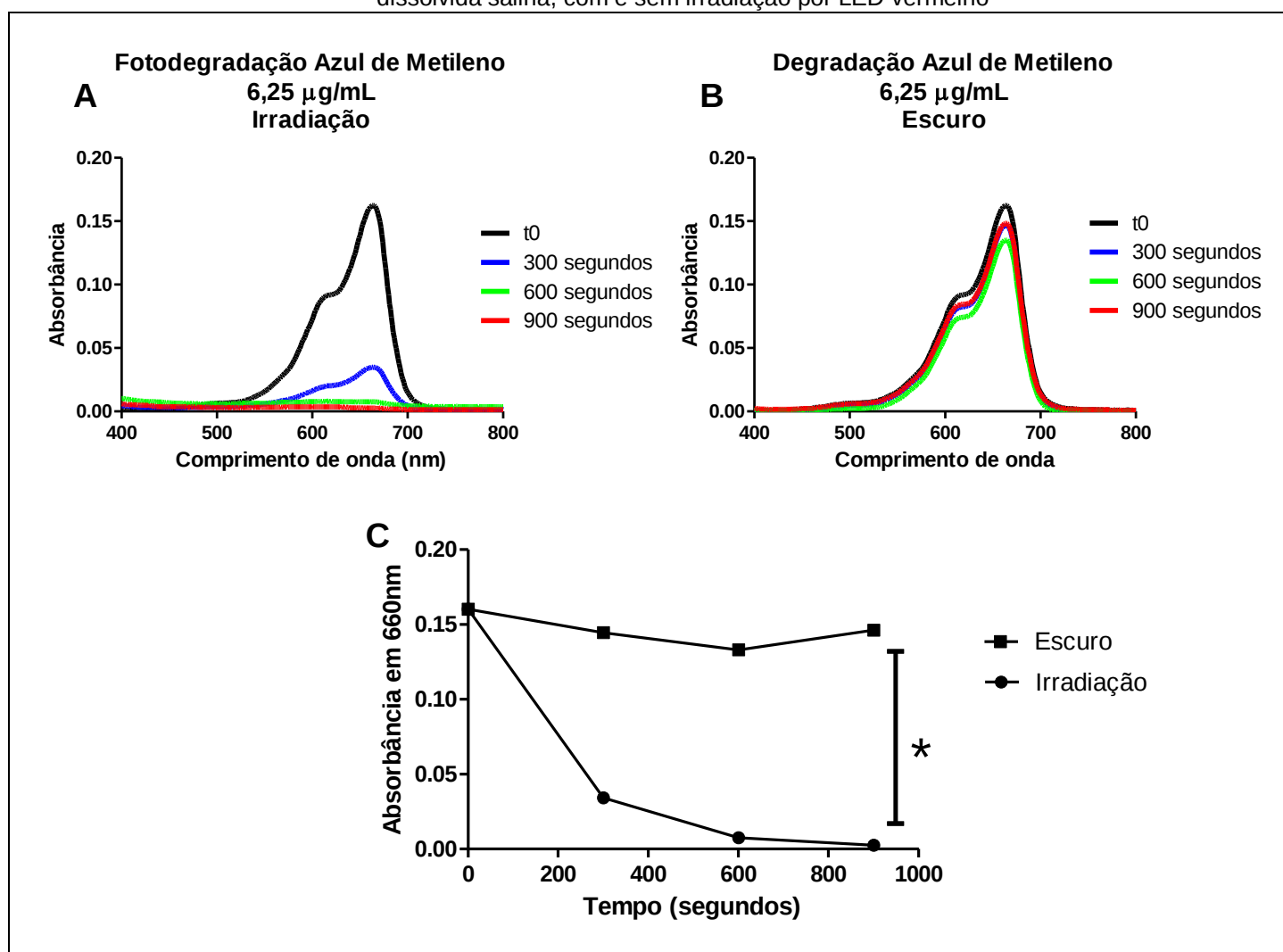
Fotodegradação é um processo de decomposição de um composto pela presença da energia do fóton. O processo começa quando o elétron da camada de valência é excitado, saltando desse nível e criando um buraco que pode interagir com o um solvente, normalmente água, para formar radicais  $\text{OH}^{\bullet}$ , que são fortes agentes oxidantes. Os elétrons excitados reagirão com oxigênio no ambiente e produzirão  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , que atua como um agente redutor. Os radicais podem continuar a reagir e formar compostos orgânicos alvo devido às suas propriedades ativas (KHOLIMATUSSA'DIAH; DYAH ASTUTI; APSARI, 2020).

A fotodegradação não implica necessariamente em uma eficácia ou atividade fotodinâmica mais baixa. Na verdade, devido aos mecanismos oxidativos da fototransformação, pode ser possível fazer uma correlação diretamente proporcional à atividade fotodinâmica e a fotodegradação do FS: a geração de radicais livres ou  $^1\text{O}_2$  da fotoreação determina a atividade fotodinâmica, bem como a degradação do FS (FERREIRA et al., 2008).

Nas figuras 10, 11, 12, 13 e 14 estão demonstrados os resultados obtidos do teste de fotodegradação do AM (6,25 – 100 µg/mL). Em “A” está representado o

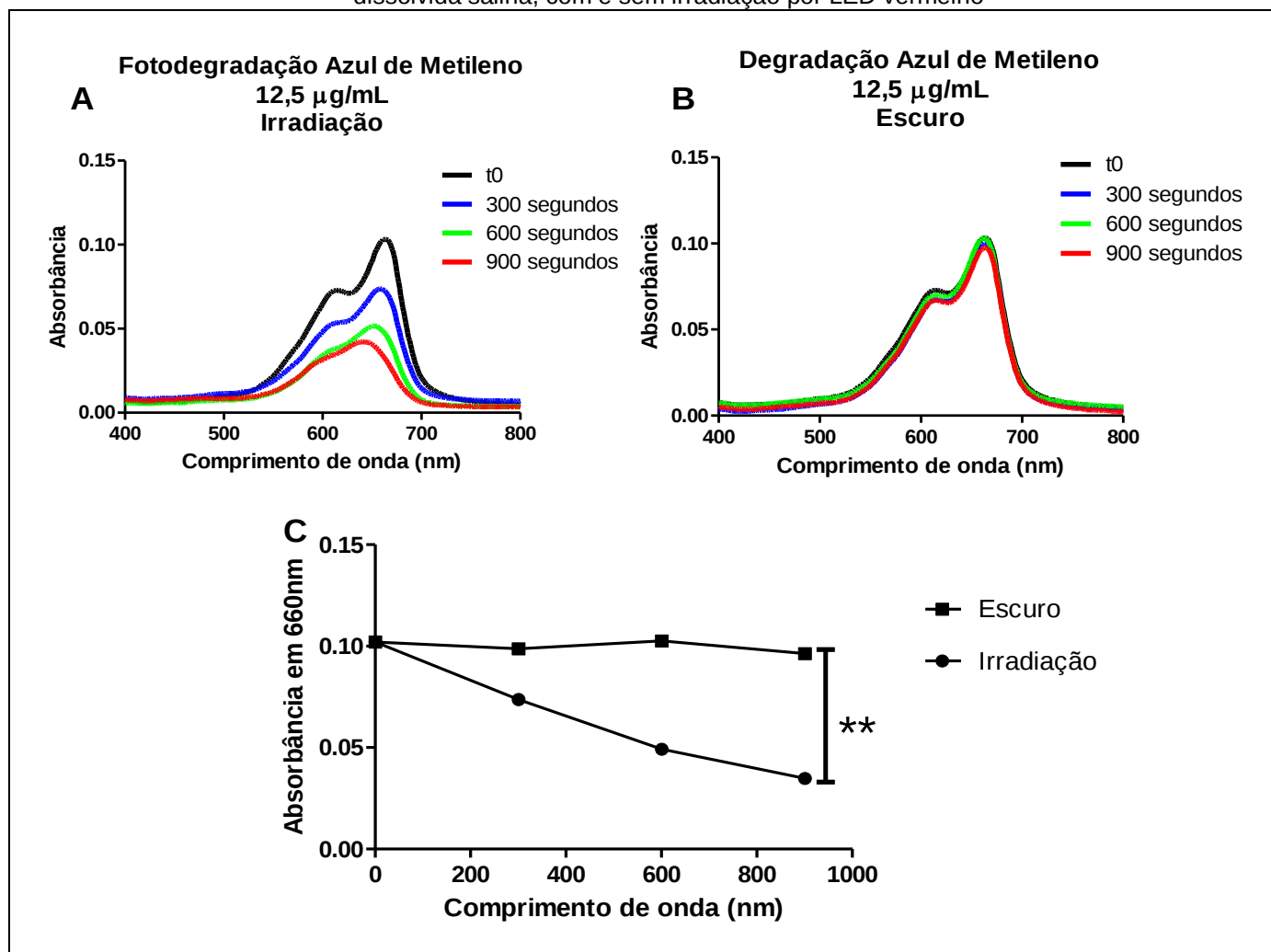
espectro de absorção de luz das soluções submetidas à irradiação, em “B” está representado o espectro de absorção de luz das soluções mantidas no escuro pelo mesmo tempo que as soluções em “A” foram irradiadas; já o gráfico “C” representa a comparação das absorbâncias no pico de absorção máxima (660 nm) para cada tempo de irradiação, com avaliação estatística via *one-way* ANOVA com pós teste de Tukey.

Figura 10. Espectros de absorção de luz da fotodegradação do Azul de metileno (6,25 µg/mL) dissolvida salina, com e sem irradiação por LED vermelho



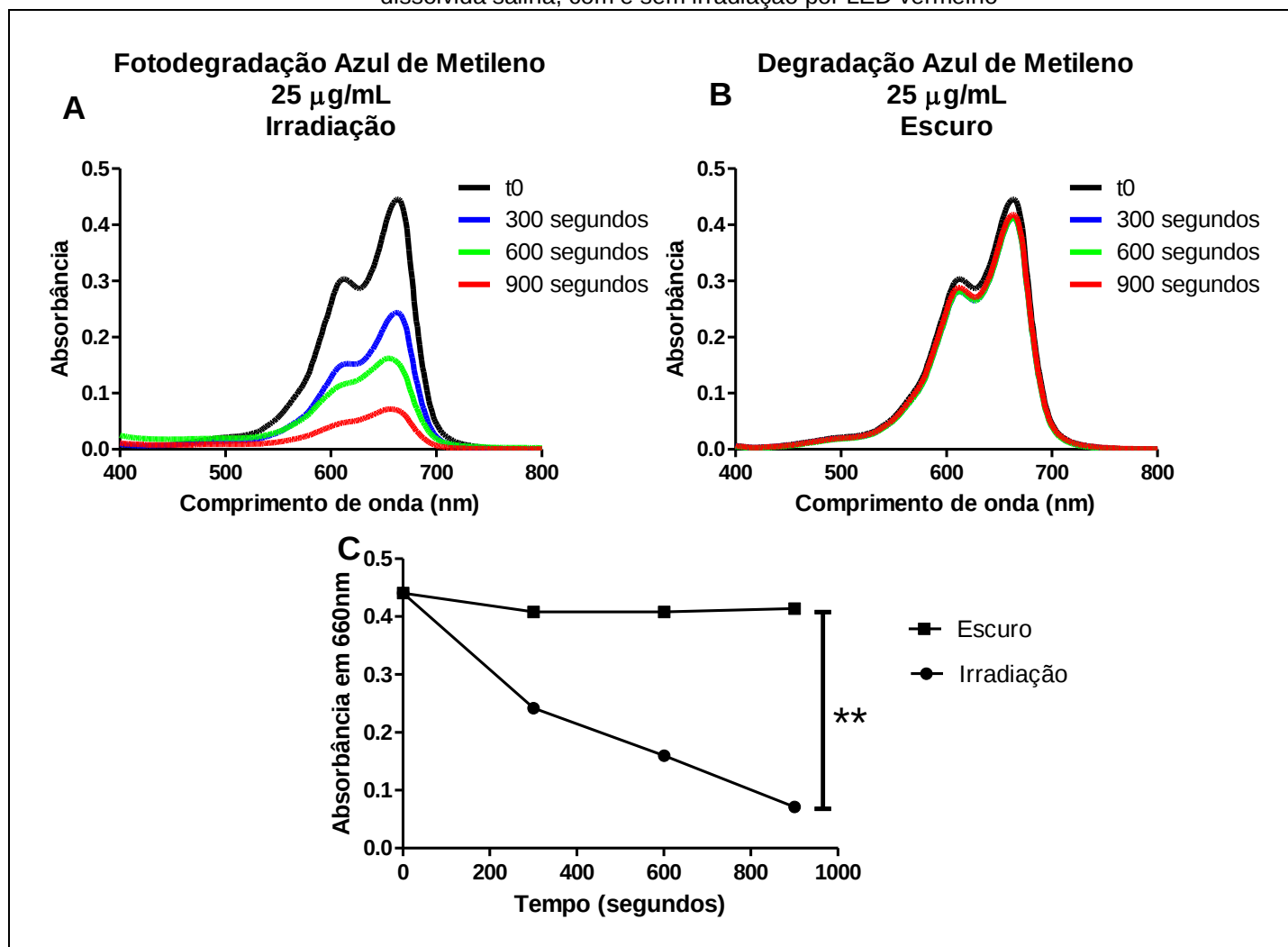
Na figura está representada os espectros de absorção de luz de 400 a 800 nm da fotodegradação do Azul de Metileno a 6,25 µg/mL solubilizado em salina nos tempos de 0 a 900 segundos, após irradiação a 65,66 J/cm<sup>2</sup> (79,96 mW/cm<sup>2</sup>) (gráfico A) e no escuro (gráfico B). O gráfico C representa a comparação entre as absorbâncias em 660 nm dos gráficos A e B. O asterisco representa a diferença estatística entre a absorbância no escuro e após irradiação (pós teste de Tukey). \*p<0,05. Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 11. Espectros de absorção de luz da fotodegradação do Azul de metileno (12,5 µg/mL) dissolvida salina, com e sem irradiação por LED vermelho



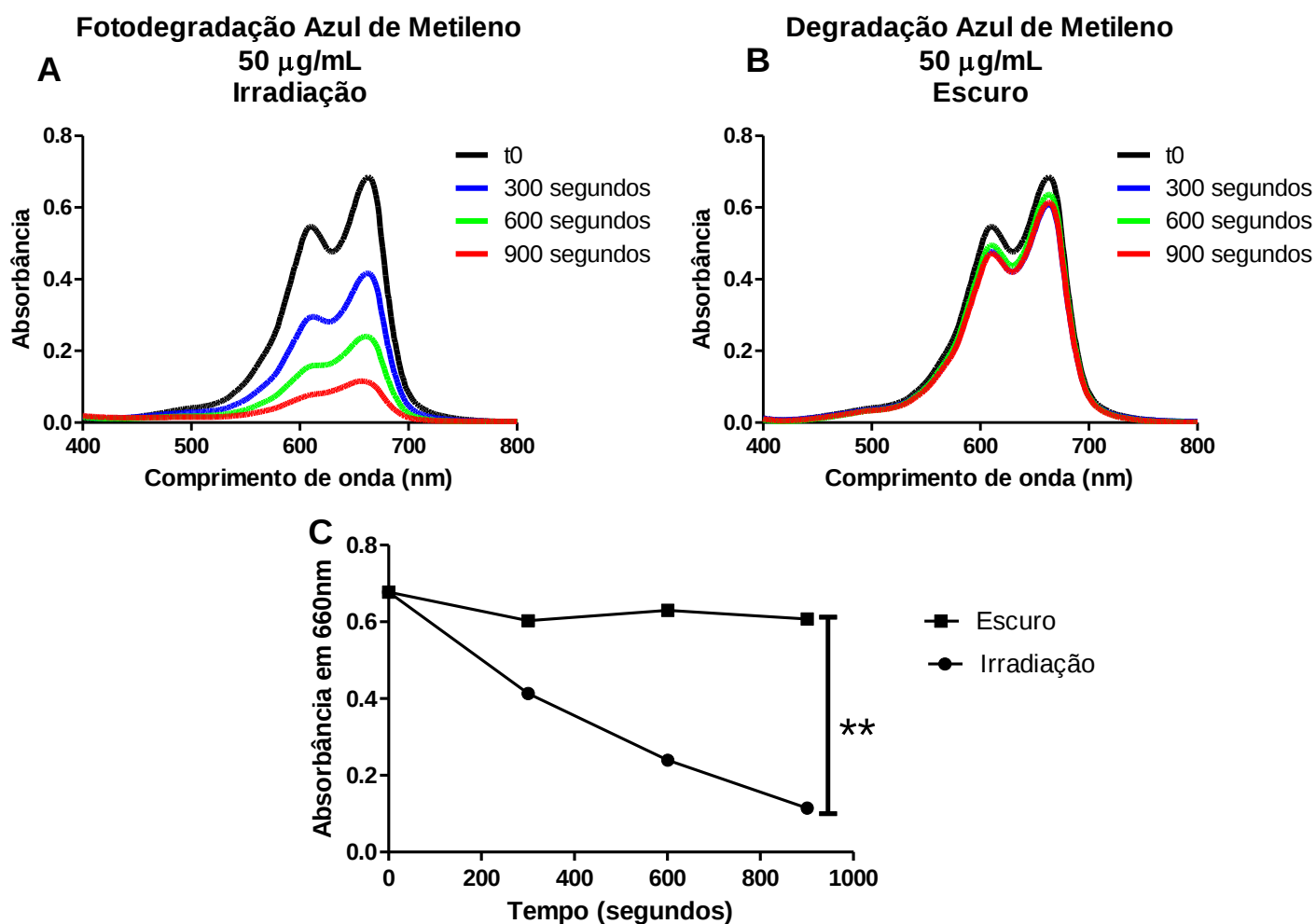
Na figura está representada os espectros de absorção de luz de 400 a 800 nm da fotodegradação do Azul de Metileno a 12,5 µg/mL solubilizado em salina nos tempos de 0 a 900 segundos, após irradiação a 65,66 J/cm<sup>2</sup> (79,96 mW/cm<sup>2</sup>) (gráfico A) e no escuro (gráfico B). O gráfico C representa a comparação entre as absorbâncias em 660 nm dos gráficos A e B. O asterisco representa a diferença estatística entre a absorbância no escuro e após irradiação (pós teste de Tukey). \*\*p<0,01. Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 12. Espectros de absorção de luz da fotodegradação do Azul de metileno (25 µg/mL) dissolvida salina, com e sem irradiação por LED vermelho



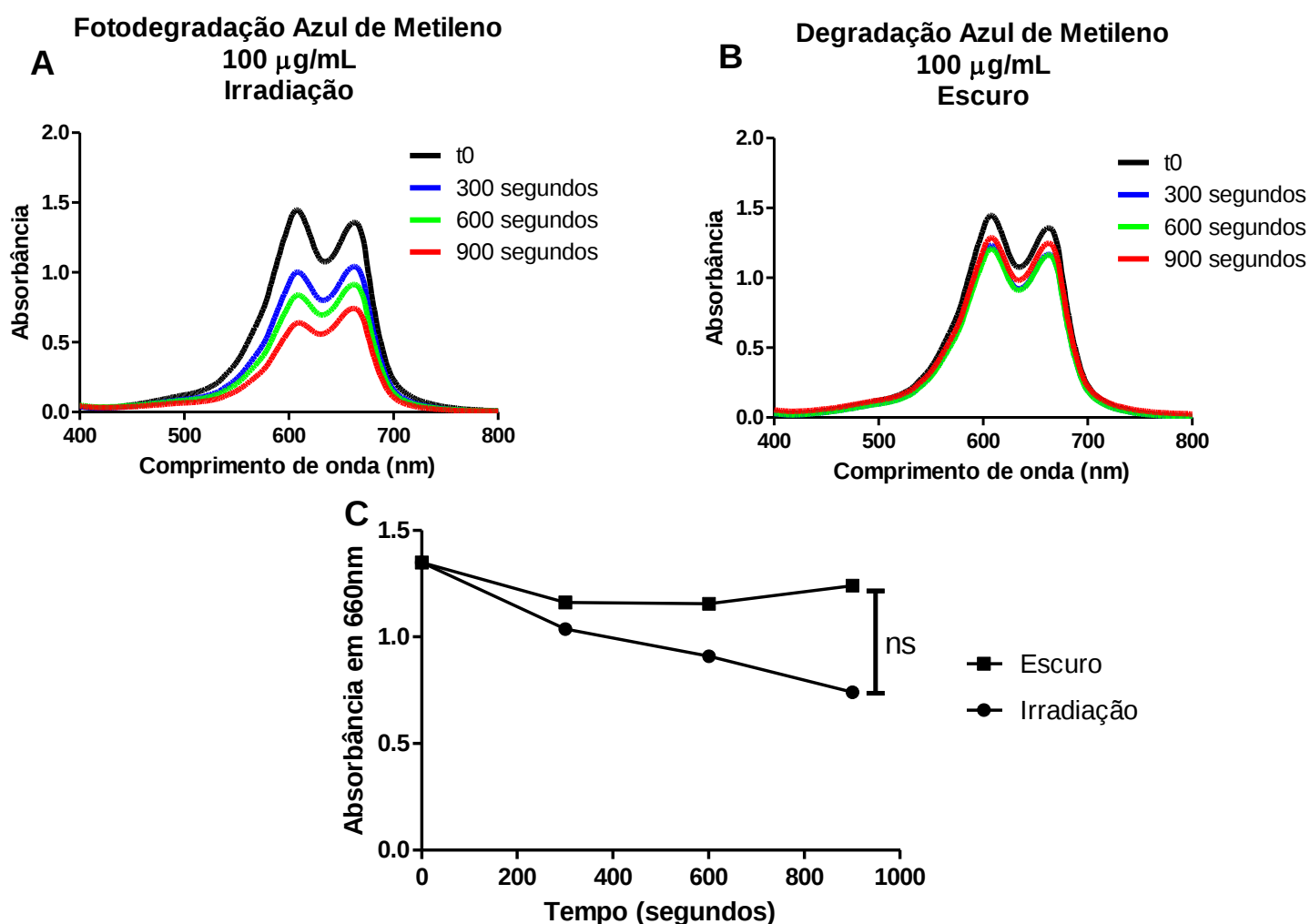
Na figura está representada os espectros de absorção de luz de 400 a 800 nm da fotodegradação do Azul de Metileno a 25 µg/mL solubilizado em salina nos tempos de 0 a 900 segundos, após irradiação a 65,66 J/cm<sup>2</sup> (79,96 mW/cm<sup>2</sup>) (gráfico A) e no escuro (gráfico B). O gráfico C representa a comparação entre as absorbâncias em 660 nm dos gráficos A e B. O asterisco representa a diferença estatística entre a absorbância no escuro e após irradiação (pós teste de Tukey). \*\*p<0,01. Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 13. Espectros de absorção de luz da fotodegradação do Azul de metileno (50 µg/mL) dissolvida salina, com e sem irradiação por LED vermelho



Na figura está representada os espectros de absorção de luz de 400 a 800 nm da fotodegradação do Azul de Metileno a 50 µg/mL solubilizado em salina nos tempos de 0 a 900 segundos, após irradiação a 65,66 J/cm<sup>2</sup> (79,96 mW/cm<sup>2</sup>) (gráfico A) e no escuro (gráfico B). O gráfico C representa a comparação entre as absorbâncias em 660 nm dos gráficos A e B. O asterisco representa a diferença estatística entre a absorbância no escuro e após irradiação (pós teste de Tukey). \*\*p<0,01. Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 14. Espectros de absorção de luz da fotodegradação do Azul de metileno (100 µg/mL) dissolvida salina, com e sem irradiação por LED vermelho



Na figura estão representados os espectros de absorção de luz de 400 a 800 nm da fotodegradação do Azul de Metileno a 100 µg/mL solubilizado em salina nos tempos de 0 a 900 segundos, após irradiação a 65,66 J/cm<sup>2</sup> (79,96 mW/cm<sup>2</sup>) (gráfico A) e no escuro (gráfico B). O gráfico C representa a comparação entre as absorbâncias em 660 nm dos gráficos A e B. Ns representa que não houve diferença estatística entre a absorbância no escuro e após irradiação (pós teste de Tukey). Fonte: Autoria própria, 2022.

Na tabela 1 estão demonstrados os níveis de significância obtidos da diferença da absorbância no escuro e após irradiação, em 660nm, obtidos após a aplicação de pós teste de Tukey.

Tabela 1. Nível de significância da diferença da absorbância em 660 nm no escuro e após irradiação na fotodegradação do Azul de Metileno

| <b>Azul de metileno (µg/mL)</b> | <b>Nível de significância (p)</b> |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| 6,25                            | 0,0111                            |
| 12,5                            | 0,0032                            |
| 25                              | 0,0031                            |
| 50                              | 0,0091                            |
| 100                             | ns                                |

A tabela representa a diferença estatística pós teste de Tukey entre a absorbância em 660 nm da fotodegradação do Azul de Metileno (6,25 – 100 µg/mL) solubilizado em salina, no escuro e após irradiação a 65,66 J/cm<sup>2</sup> (79,96 mW/cm<sup>2</sup>). Fonte: Autoria própria, 2022.

A avaliação da taxa de fotodegradação permite estimar a fluência de luz que pode ser usada para TFDa sem uma diminuição significativa da eficiência devido à fotodegradação do FS (TIGANOVA et al., 2022). Na tabela 2 estão expostas as taxas de fotodegradação do AM após a irradiação.

Tabela 2. Taxa de Fotodegradação do Azul de Metileno

| <b>Azul de metileno (µg/mL)</b> | <b>Taxa de Fotodegradação (%)</b> |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| 6,25                            | 98                                |
| 12,5                            | 66                                |
| 25                              | 84                                |
| 50                              | 83                                |
| 100                             | 45                                |

A tabela representa as taxas de fotodegradação do Azul de Metileno (6,25 – 100 µg/mL) solubilizado em salina após irradiação a 65,66 J/cm<sup>2</sup> (79,96 mW/cm<sup>2</sup>) por LED vermelho (660 nm). Fonte: Autoria própria, 2022.

O ensaio de fotodegradação do AM demonstrou que o a concentração mais baixa testada (6,25 µg/mL) fotodegradou quase completamente (98%), não demonstrando pico de absorção no segundo tempo de irradiação testado.

Nas outras concentrações testadas (12,5 – 100 µg/mL) é possível notar os picos característicos do AM durante todo o tempo de irradiação, com diminuição da absorbância de acordo com o tempo.

Sabe-se que a cor de AM depende de seus grupos cromofóricos e auxocromo. O grupo cromóforo de AM é o sistema conjugado N-S no heterociclo aromático central, enquanto o grupo auxocromo é grupos contendo N com elétrons de par solitário no anel de benzeno (YANG et al., 2017) e esse anel benzeno substituído aparece como pico de absorção de luz no espectro UV-Vis na região de 292 e 245 nm (MONDAL; REYES; PAL, 2017).

Picos na região de absorção mais intenso em torno de 664 nm estão associado a monômeros de AM, com um pico em cerca de 660 nm atribuído ao dímero (MONDAL; REYES; PAL, 2017). Conforme a concentração do FS foi aumentando, foi possível observar que o pico máximo de absorbância na região de 600 nm aumentou proporcionalmente com concentração, o que indica agregação do AM, possivelmente devido à alta concentração de FS.

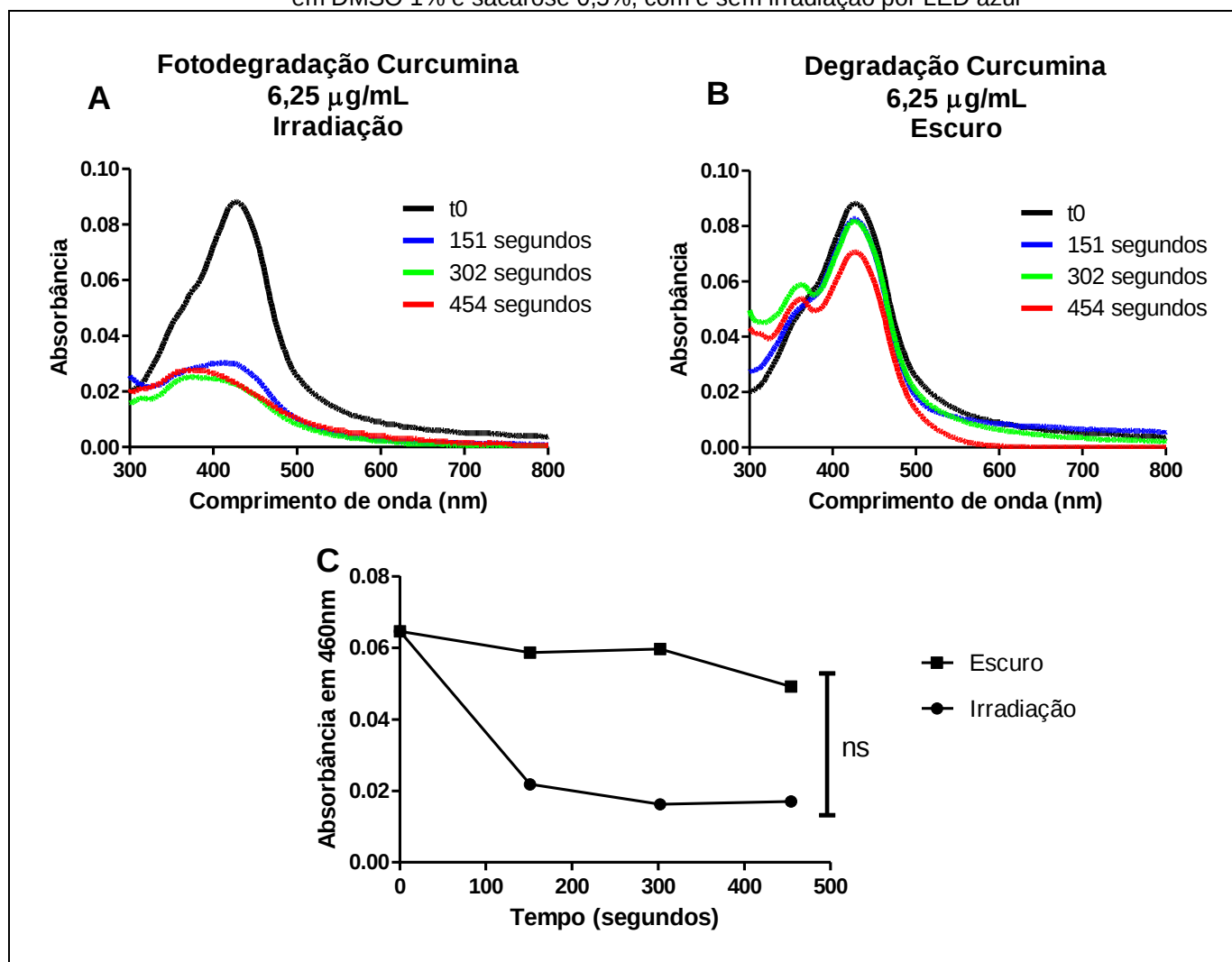
Durante a irradiação, o pico na região de 600 nm tendeu a diminuir drasticamente. Tais resultados também foram obtidos por Lin et al., 2018 e Sampaio et al., 2020.

Além disso, a taxa de fotodegradação se tornou menor conforme o aumento da concentração, assim como a diferença das absorbâncias no escuro e após irradiação, demonstrando que o impacto dessa se tornou menor conforme a concentração de AM foi aumentando.

Com isso, pode-se concluir que as concentrações que suportam a irradiação pelos parâmetros utilizados são 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL, sendo possíveis candidatos ao teste de TFDa.

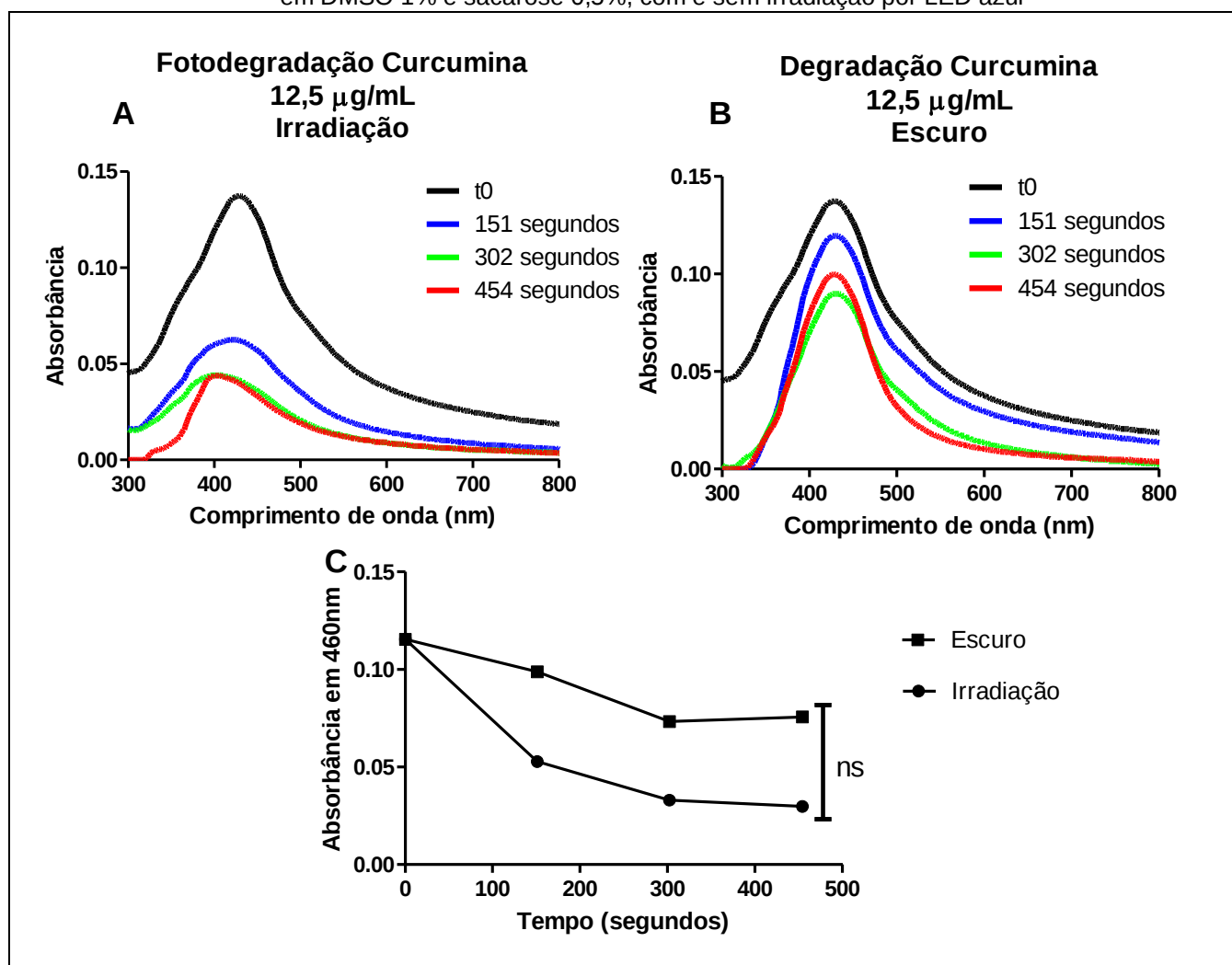
Em relação ao outro FS utilizado nesse estudo, as figuras 15, 16 e 17 demonstram os resultados da fotodegradação da CUR (6,25 – 25 µg/mL). Como nos gráficos já apresentados, o gráfico “A” demonstra o espectro de absorção de luz das soluções submetidas à irradiação, o gráfico “B” representa o espectro de absorção de luz das soluções mantidas no escuro pelo mesmo tempo que as soluções em “A” foram irradiadas e o gráfico “C” representa a comparação das absorbâncias no pico de absorção máxima (460 nm) para cada tempo de irradiação, com avaliação estatística via pós teste de Tukey.

Figura 15. Espectros de absorção de luz da fotodegradação da Curcumina (6,25  $\mu\text{g/mL}$ ) dissolvida em DMSO 1% e sacarose 0,5%, com e sem irradiação por LED azul



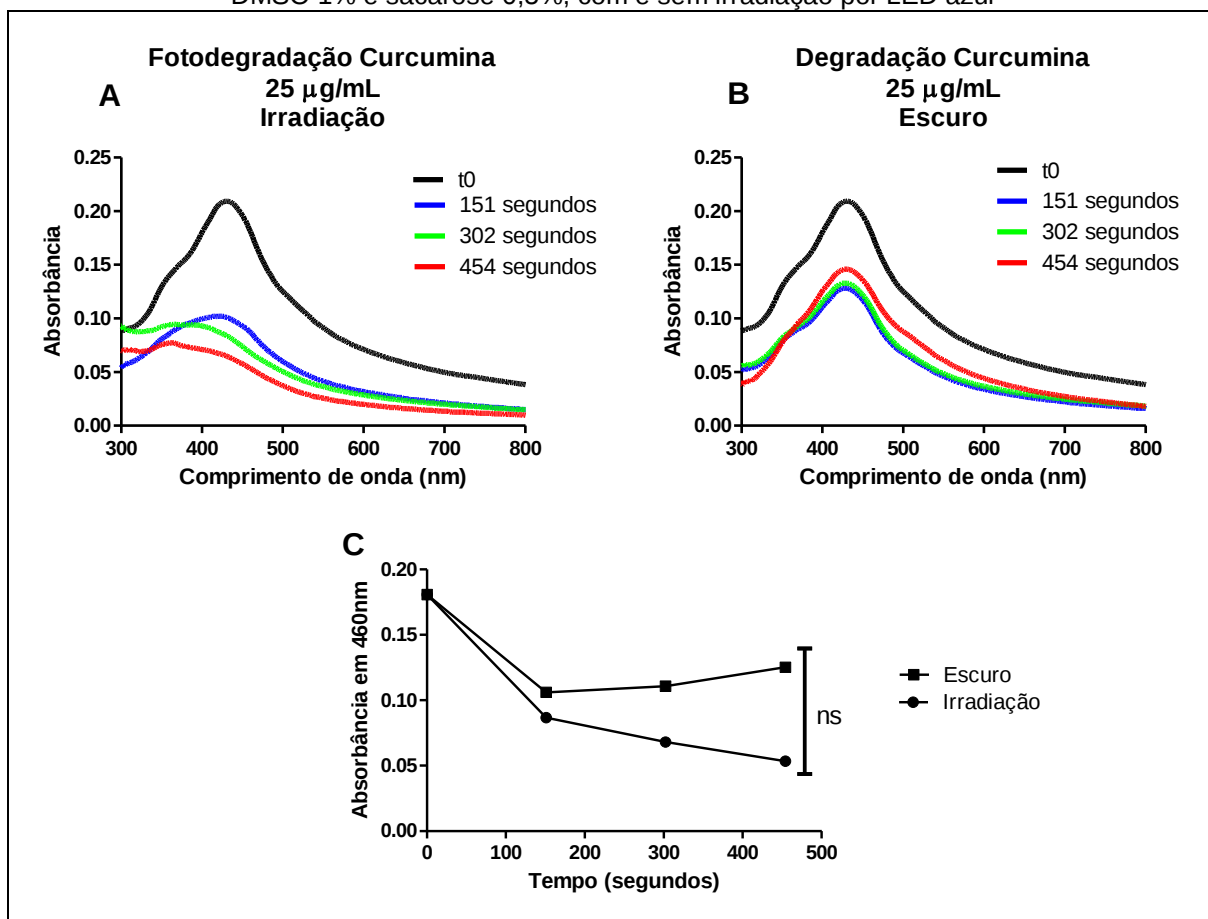
Na figura estão representados os espectros de absorção de luz de 300 a 800 nm da fotodegradação da Curcumina a 6,25  $\mu\text{g/mL}$  solubilizada em DMSO 1% e sacarose 0,5% nos tempos de 0 a 454 segundos, após irradiação a 25  $\text{J/cm}^2$  (55  $\text{mW/cm}^2$ ) (gráfico A) e no escuro (gráfico B). O gráfico C representa a comparação entre as absorbâncias em 460 nm dos gráficos A e B. Ns representa que não houve diferença estatística entre a absorbância no escuro e após irradiação (pós teste de Tukey). Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 16. Espectros de absorção de luz da fotodegradação da Curcumina ( $12,5 \mu\text{g/mL}$ ) dissolvida em DMSO 1% e sacarose 0,5%, com e sem irradiação por LED azul



Na figura estão representados os espectros de absorção de luz de 300 a 800 nm da fotodegradação da Curcumina a  $12,5 \mu\text{g/mL}$  solubilizada em DMSO 1% e sacarose 0,5% nos tempos de 0 a 454 segundos, após irradiação a  $25 \text{ J/cm}^2$  ( $55 \text{ mW/cm}^2$ ) (gráfico A) e no escuro (gráfico B). O gráfico C representa a comparação entre as absorbâncias em 460 nm dos gráficos A e B. ns representa que não houve diferença estatística entre a absorbância no escuro e após irradiação (pós teste de Tukey). Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 17. Espectros de absorção de luz da fotodegradação da Curcumina (25  $\mu\text{g/mL}$ ) dissolvida em DMSO 1% e sacarose 0,5%, com e sem irradiação por LED azul



Na figura estão representados os espectros de absorção de luz de 300 a 800 nm da fotodegradação da Curcumina a 25  $\mu\text{g/mL}$  solubilizada em DMSO 1% e sacarose 0,5% nos tempos de 0 a 454 segundos, após irradiação a 25  $\text{J/cm}^2$  (55  $\text{mW/cm}^2$ ) (gráfico A) e no escuro (gráfico B). O gráfico C representa a comparação entre as absorbâncias em 460 nm dos gráficos A e B. ns representa que não houve diferença estatística entre a absorbância no escuro e após irradiação (pós teste de Tukey).  
Fonte: Autoria própria, 2022.

Na tabela 3 estão expostas as taxas de fotodegradação da CUR no escuro e após a irradiação.

Tabela 3 Taxa de Degradação da Curcumina no escuro e após irradiação

| Curcumina<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Taxa de Degradação (%) |        |
|-----------------------------------|------------------------|--------|
|                                   | Irradiação             | Escuro |
| 6,25                              | 73                     | 24     |
| 12,5                              | 74                     | 34     |
| 25                                | 70                     | 30     |

A tabela representa as taxas de degradação da Curcumina (6,25 – 25  $\mu\text{g/mL}$ ) dissolvida em DMSO 1% e sacarose 0,5%, no escuro e após irradiação a 25  $\text{J/cm}^2$  (55  $\text{mW/cm}^2$ ) por LED azul (460 nm). Fonte: Autoria própria, 2022.

Na cinética da fotodegradação foi possível notar deslocamento à esquerda do pico máximo de absorção de luz conforme o tempo de irradiação. Tal fato também foi notado por Sampaio et al. (2020), que avaliou que o pico deslocou de 440 nm para 380 nm após irradiação fracionada ou contínua. Os autores acreditam que tal fato ocorra devido a formação de produtos de fotodegradação da CUR que absorvem luz em comprimentos de onda mais curtos (SAMPAIO et al., 2020)

Os gráficos “C” das três últimas figuras não apresentaram diferença estatística na absorbância após irradiação e no escuro. A taxa de degradação demonstrou que as três concentrações avaliadas obtiveram aproximadamente a mesma degradação no escuro (aproximadamente 30%) e após irradiação (aproximadamente 70%).

Tais dados levam a crer que a CUR não possui grande estabilidade e passa pelo processo de degradação no escuro, possivelmente devido à mesma estar em um meio predominantemente hídrico e estar susceptível à fragmentação molecular por hidrólise (MONDAL; GHOSH; MOULIK, 2016).

Apesar da aparente falta de estabilidade, as três concentrações avaliadas suportaram os parâmetros de irradiação estabelecidos e demonstraram pico de absorção de luz característico de CUR, podendo-se concluir que as três concentrações são viáveis para serem testadas na TFDa.

### 4.3. Avaliação das Concentrações Inibitória Mínima e Bactericida Mínima do inibidor 3-AT sobre *S. aureus*

Concentrações inibitórias Mínimas (MIC) são consideradas “padrão ouro” para determinação de susceptibilidade microbiana à antimicrobianos, fazendo com que tal característica possa ser usada na avaliação de outros métodos de susceptibilidade (ANDREWS, 2001).

Já a Concentração Bactericida Mínima (CBM) pode ser definida como a concentração mais baixa do antimicrobiano que vai impedir o crescimento de mais de 99,9% da população original do organismo depois de uma subcultura em meio livre de antibiótico (ANDREWS, 2001; PETRUS et al., 2011).

Na literatura não foram encontrados resultados de MIC e CBM para o 3-AT, mas sim para moléculas derivadas. Exemplos são derivados de 1,2,4-triazol, como 3-(5-acylamino triazolyl)- naphthyridones e 3-(5-benzylidineamino triazolyl)-naphthyridones contra *Bacillus subtilis* (MOHAMED et al., 2018), derivados de 1,2,4-triazole-3-tiona contra MRSA, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *M. luteus*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Haemophilus parainfluenzae* (KOSIKOWSKA et al., 2016; PLECH et al., 2013) e derivados de 1,2,4-triazol contra MRSA (PLECH et al., 2015a, 2015b).

Com isso, surgiu a necessidade de realizar tais testes para o 3-AT em si, visando encontrar uma concentração que possua o mínimo de redução bacteriana e não apresente morte bacteriana. A tabela 4 mostra os dados de porcentagem de inibição do crescimento bacteriana após 24 horas na presença do 3-AT (10 – 60 µg/mL), de acordo com o protocolo da CLSI (2012).

Tabela 4. Porcentagem de redução do crescimento bacteriano na presença do 3-AT

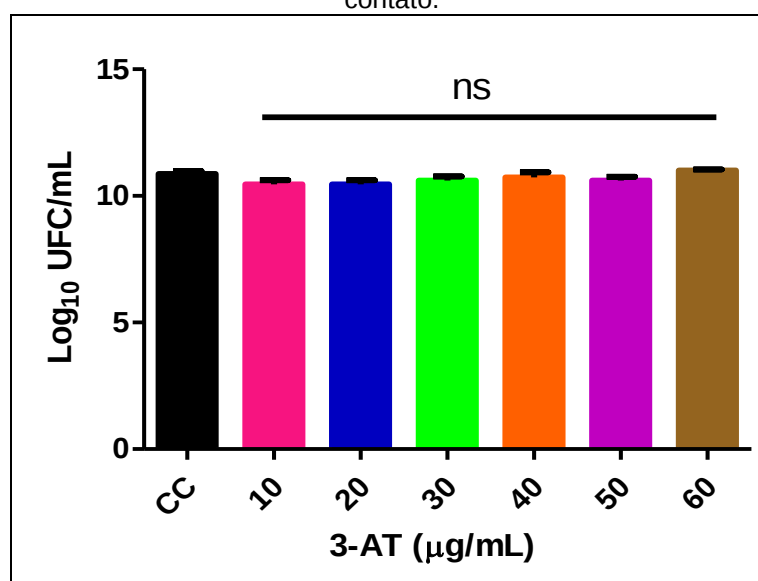
| 3-AT (µg/mL) | % Inibição |
|--------------|------------|
| 10           | 23,02      |
| 20           | 24,72      |
| 30           | 29,61      |
| 40           | 34,6       |
| 50           | 37,98      |
| 60           | 32,27      |

A tabela representa a porcentagem de redução de crescimento bacteriano devido a presença do 3-AT (10 – 60 µg/mL). Fonte: Autoria própria, 2021.

Foi possível fazer uma correlação diretamente proporcional entre a concentração de 3-AT e a porcentagem de redução do crescimento da suspensão bacteriana, pois a inibição do crescimento bacteriano aumentou de acordo com a concentração do inibidor. O inibidor não apresentou CIM nas concentrações avaliadas.

Na figura 18 está demonstrado o resultado da avaliação da toxicidade do 3-AT na suspensão bacteriana após 24 horas de contato com o 3-AT.

Figura 18. Avaliação da toxicidade do 3-AT na suspensão bacteriana de *S. aureus* após 24 horas de contato.



O gráfico representa a avaliação da toxicidade em 24 horas do 3-AT (10 - 60 µg/mL) solubilizado em salina, em que as colunas representam os valores médios de log<sub>10</sub> entre os grupos controle de crescimento (CC) e as concentrações testadas de 3-AT. As barras representam o desvio-padrão (n=3). Ns (não significativo) representa diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey). Fonte: Autoria própria, 2021.

É possível notar no gráfico que não houve alterações significativas no Log<sub>10</sub> UFC/mL em relação ao controle, demonstrando que o inibidor da catalase não levou a morte bacteriana. O inibidor não apresentou CBM nas apresentações avaliadas.

Em resumo, a somatória dos resultados dos testes de CIM e CBM nos leva a crer que, sob suspensão bacteriana de *S. aureus*, o 3-AT é capaz de reduzir o crescimento bacteriano e não levar à morte bacteriana.

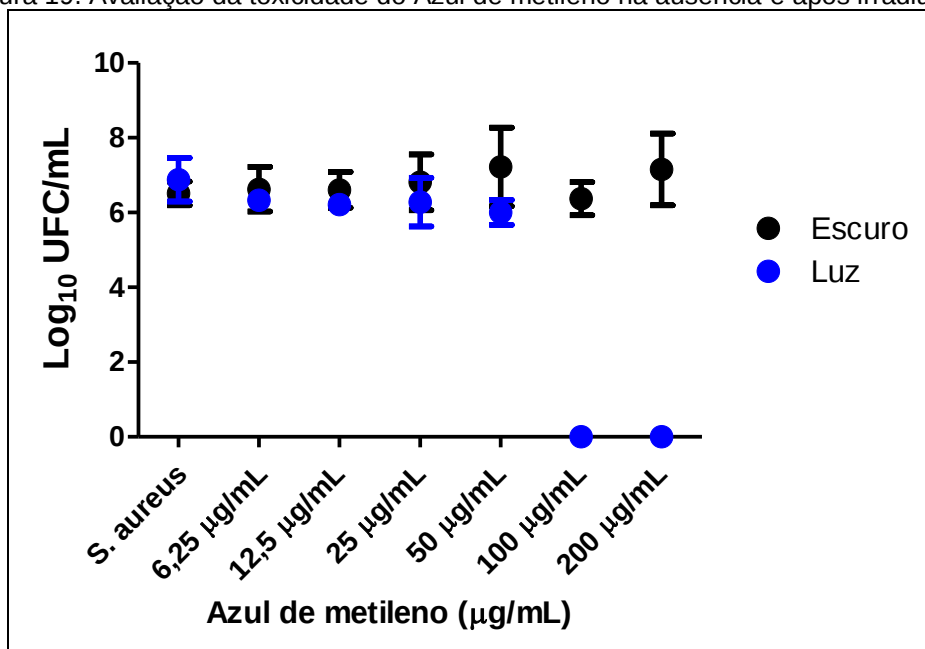
#### 4.4. Testes de susceptibilidade bacteriana frente à TFD

##### 4.4.1. Primeira etapa

Por definição, um FS deve possuir baixa toxicidade no escuro (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; YOON; LI; SHIM, 2013), ou seja, não deve possuir atividade antimicrobiana quando não é exposto a irradiação. Com isso em mente, foram avaliados a toxicidade no escuro e a redução bacteriana após TFDa mediada pelos dois FSs utilizados nesse estudo, visando encontrar os parâmetros ideais de TFDa para avaliação do sinergismo com o inibidor de catalase.

A figura 19 demonstra os gráficos de avaliação da toxicidade no escuro e após irradiação de 65,66 J/cm<sup>2</sup> (72,96 mW/cm<sup>2</sup>) em fonte de luz de 660nm, com tempo de pré-incubação igual a 10 minutos e irradiação por 15 minutos do AM. Foi demonstrado que no escuro não houve redução significativa do número de unidades formadoras de colônia (UFC)/mL, podendo inferir que, sem ser ativado por irradiação, o FS não demonstrou atividade bactericida.

Figura 19. Avaliação da toxicidade do Azul de metileno na ausência e após irradiação.



Os gráficos representam a avaliação da toxicidade no escuro e após irradiação por LED 660 nm do Azul de metileno (6,25 - 100 µg/mL) solubilizado em salina, em que os círculos representam os valores médios de log<sub>10</sub> entre os grupos controle de crescimento (CC) e Azul de metileno 6,25 µg/mL (gráfico A), 12,5 a 50 µg/mL (gráfico B) e 100 e 200 µg/mL (gráfico C) de três experimentos independentes e os círculos representam o intervalo de confiança de 95% (n=9) (one-way ANOVA). Para avaliação da toxicidade no escuro, as amostras foram deixadas no escuro e em temperatura ambiente pelos tempos de pré-incubação e irradiação; já para a avaliação após irradiação, a fluência de luz foi igual a 65,66 J/cm<sup>2</sup> (72,96 mW/cm<sup>2</sup>) em irradiação por LED de 660nm, com tempo de pré-incubação igual a 10 minutos e irradiação por 900 segundos. Fonte: Autoria própria, 2021.

Uma vez confirmado que o AM não possui atividade bactericida no escuro, foi avaliado a fluência e a taxa de fluência sub-ótima a serem utilizadas nas próximas etapas do estudo, de forma a maximizar o impacto do inibidor de catalase. Por definição, uma fluência sub-ótima é aquela que apresenta redução menor a  $3 \log_{10}$  (ALVES et al., 2009; KNAPP; MOODY, 1992; ZAGO et al., 2020).

Na tabela 5 estão expostos a concentrações avaliadas de AM com as respectivas reduções bacterianas após a aplicação de TDFa, em UFC/mL. A concentração escolhida para avaliação da sinergia com o inibidor de catalase foi a de 50  $\mu\text{g/mL}$ , por ter tido redução menor a  $3 \log_{10}$  (0,51  $\log_{10}$  UFC/mL) e não ser alta o suficiente para formar agregados de AM.

Tabela 5. Redução bacteriana pós Terapia Fotodinâmica mediada por Azul de Metileno

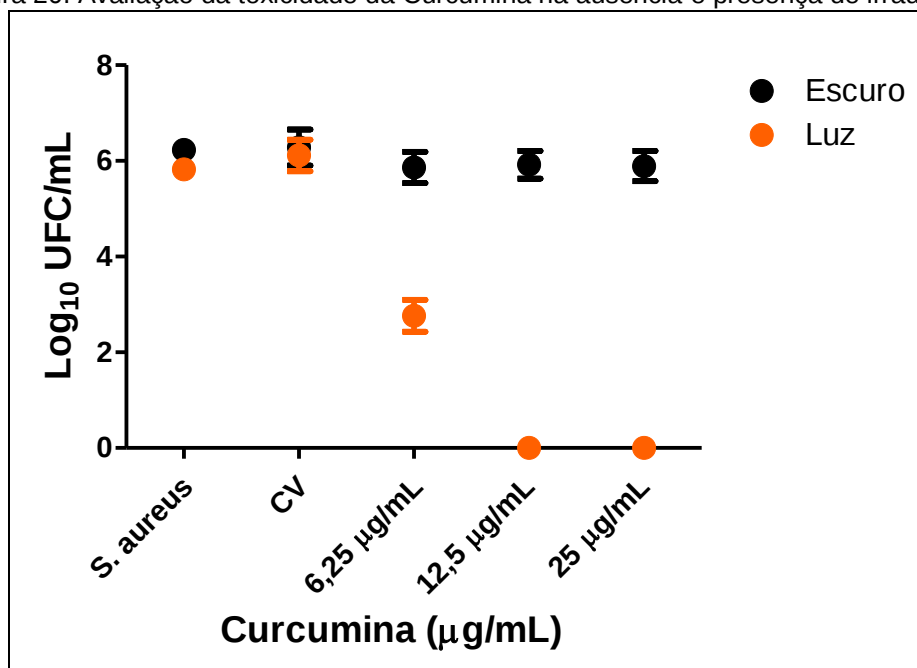
| <b>Azul de metileno (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> | <b>Redução (<math>\log_{10}</math> UFC/mL)</b> |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 6,25                                                  | 0,18                                           |
| 12,5                                                  | 0,30                                           |
| 25                                                    | 0,24                                           |
| 50                                                    | 0,51                                           |
| 100                                                   | 6,72                                           |
| 200                                                   | 6,72                                           |

A tabela representa a redução bacteriana (em  $\log_{10}$  UFC/mL) após tratamento com terapia fotodinâmica mediada por Azul de metileno (6,25 – 200  $\mu\text{g/mL}$ ) solubilizado em salina estéril. Fonte: Autoria própria, 2021.

Uma vez padronizada a TFDa mediado por AM, foi iniciado a padronização da TFDa mediada por CUR. Foram avaliadas concentrações de CUR de 6,25 a 25  $\mu\text{g/mL}$ .

A figura 20 demonstra que, assim como o AM, a CUR também não demonstrou redução significativa do número de UFC/mL, mostrando que a mesma não apresenta toxicidade no escuro; já, ao ser exposta a irradiação por LED azul (460 nm) em fluência de 25  $\text{J/cm}^2$  e taxa de fluência de 55  $\text{mW/cm}^2$ , com tempos de pré-irradiação de 30 minutos e irradiação de 7,5 minutos, a CUR demonstrou grande poder de redução bacteriana.

Figura 20. Avaliação da toxicidade da Curcumina na ausência e presença de irradiação.



O gráfico representa a avaliação da toxicidade no escuro e após irradiação da Curcumina (6,25 - 25 µg/mL) dissolvida em DMSO 1% e sacarose 0,5% no tempo de inibição da catalase igual a 10 minutos. Os círculos representam os valores médios de log<sub>10</sub> entre os grupos *S. aureus*, controle de veículo (CV) e curcumina de três experimentos independentes e as barras representam o intervalo de confiança de 95% (n=9) (two-way ANOVA). Para avaliação no escuro, as amostras foram deixadas no escuro e em temperatura ambiente pelos tempos de inibição, pré-incubação e irradiação; já para avaliação da susceptibilidade bacteriana após irradiação, as amostras foram deixadas no escuro pelo período de inibição e pré-irradiação, sendo irradiadas após por LED 460 nm, fluência de 25 J/cm<sup>2</sup> (55 mW/cm<sup>2</sup>). Fonte: Autoria própria, 2021.

A tabela 6 expõe as reduções bacterianas após a aplicação de TDFa mediada por CUR, em UFC/mL. A concentração escolhida para avaliação de sinergismo com o 3-AT foi a de 6,25 µg/mL, por ter tido redução próxima a 3 log<sub>10</sub> (3,45 log<sub>10</sub> UFC/mL).

Tabela 6. Redução bacteriana pós Terapia Fotodinâmica mediada por Curcumina

| Curcumina (µg/mL) | Redução (log <sub>10</sub> UFC/mL) |
|-------------------|------------------------------------|
| 6,25              | 3,45                               |
| 12,5              | 6,21                               |
| 25                | 6,21                               |

A tabela representa a redução bacteriana (em log<sub>10</sub> UFC/mL) após tratamento com terapia fotodinâmica mediada por Curcumina (6,25 – 25 µg/mL) dissolvida em DMSO 1% e sacarose 0,5% estéril. Fonte: Autoria própria, 2021.

Como as concentrações de 12,5 e 25 µg/mL levaram à redução bacteriana total, a concentração escolhida para ser utilizada nas próximas etapas foi de 6,25 µg/mL.

Uma vez definidos os parâmetros de fluência de luz, taxa de fluência de irradiação e fluência de cada FSs, foi possível iniciar a segunda etapa do estudo, que avaliou a ação sinérgica da TFDa com o inibidor de catalase.

#### **4.4.2. Segunda etapa**

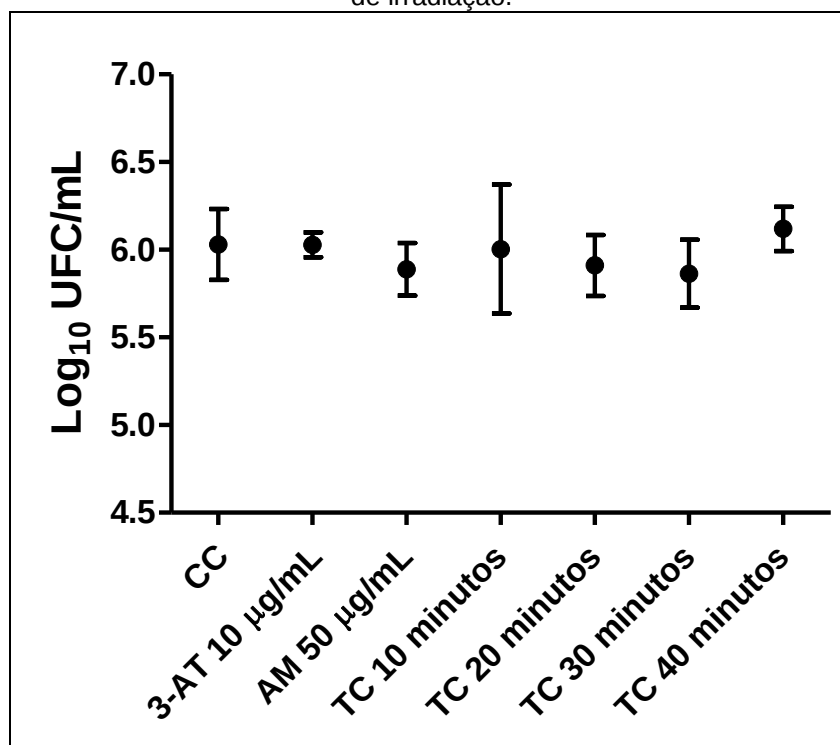
Uma vez definidos os parâmetros ideais de irradiação e as concentrações dos FSs e do inibidor, foi possível iniciar a segunda etapa do estudo, a qual visou avaliar a ocorrência de sinergismo entre o 3-AT e a TFDa. Por definição, sinergismo é observado quando o efeito das substâncias combinadas é maior do que soma do efeitos individuais (BURT, 2004).

Para tanto, foi avaliado se há sinergismo e se o tempo de inibição da catalase, isso é, o tempo que o inibidor ficou em contato com a suspensão bacteriana antes da adição do FS, impacta no mesmo.

A partir desse momento os grupos que foram tratados com 3-AT e TFDa serão referenciados por Terapia Combinada (TC).

Inicialmente foi avaliado a sinergia com a TFDa mediada por AM. Na figura 21 estão demonstrados os gráficos de avaliação da toxicidade no escuro do AM 50 µg/mL e do 3-AT 10 µg/mL para os diferentes tempos de inibição da catalase de 10 a 40 minutos.

Figura 21. Avaliação da toxicidade do Azul de metileno (50 µg/mL) e do 3-AT (10 µg/mL) na ausência de irradiação.



O gráfico representa a avaliação da toxicidade no escuro da terapia combinada mediada por Azul de metileno (50 µg/mL) solubilizado em salina nos diferentes de tempos de inibição da catalase em suspensão de *S. aureus*, de 10 a 40 minutos. Os círculos representam os valores médios de log<sub>10</sub> entre os grupos controle de crescimento (CC), Azul de metileno 50 µg/mL (AM 50 µg/mL), 3-AT 10 µg/mL e terapia combinada mediada por azul de metileno 50 µg/mL de três experimentos independentes e as barras representam o intervalo de confiança de 95% (n=9) (one-way ANOVA). As amostras foram deixas no escuro e em temperatura ambiente pelos tempos de inibição, pré-incubação e irradiação. Fonte: Autoria própria, 2022.

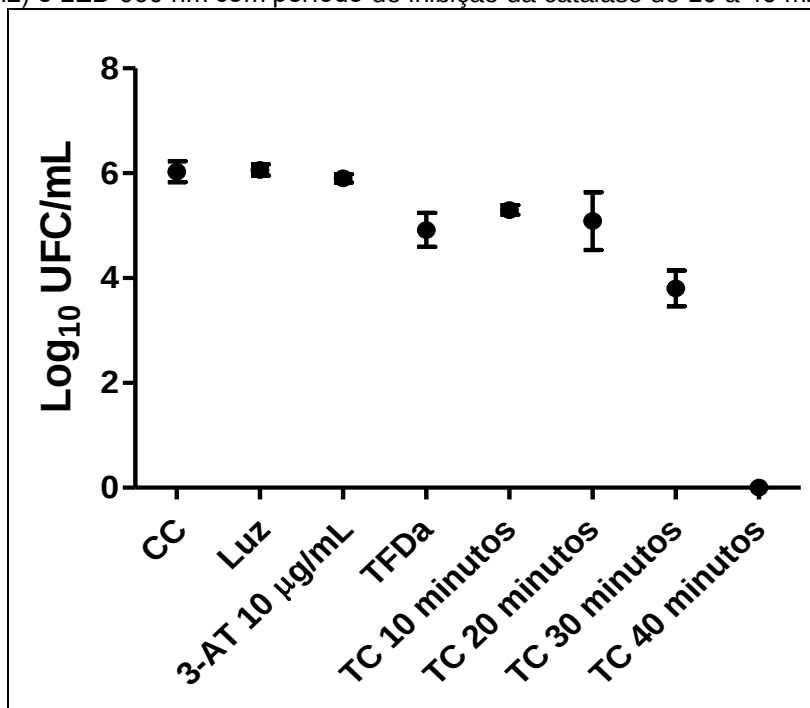
No gráfico acima estão representados os grupos controle de crescimento (CC), AM 50 µg/mL, 3-AT 10 µg/mL e TC com tempo de inibição da catalase de 10 a 40 minutos. A avaliação estatística via one-way ANOVA com pós teste de Tukey demonstrou que não houve diferença estatística entre o número de Log<sub>10</sub> de UFC/mL entre os grupos avaliados e o grupo CC.

Tal fato demonstra que tanto o AM 50 µg/mL quanto o 3-AT 10 µg/mL não possuem toxicidade no escuro, corroborando com os resultados obtidos na padronização dos parâmetros de irradiação e nos testes de CIM e CBM, respectivamente.

Ainda é possível afirmar, após avaliação dos grupos TC, que ambos (AM e 3-AT), não possuem sinergismo no escuro e não levam a morte bacteriana mesmo quando estão em contato.

A figura 22 mostra a avaliação da susceptibilidade bacteriana empregando a TFDa mediada por AM combinada com 3-AT, nos períodos de inibição da catalase de 10 a 40 minutos. Os grupos avaliados nas figuras são CC, Luz, 3-AT 10 µg/mL, TFDa e TC com tempo de inibição da catalase de 10 a 40 minutos.

Figura 22. Avaliação susceptibilidade bacteriana em fase planctônica em suspensão de *S. aureus* empregando a terapia fotodinâmica antimicrobiana combinada mediada por Azul de metileno (50 µg/mL) e LED 660 nm com período de inibição da catalase de 10 a 40 minutos.



O gráfico representa a avaliação da susceptibilidade bacteriana em fase planctônica em suspensão de *S. aureus* após Terapia Fotodinâmica antimicrobiana combinada mediada por Azul de metileno (50 µg/mL) solubilizado em salina, com tempo de inibição da catalase igual de 10 a 40 minutos. Os círculos representam os valores médios de log<sub>10</sub> entre os grupos controle de crescimento (CC), luz, 3-AT 10 µg/mL, terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) e terapia combinada (TC) de três experimentos independentes e as barras representam o intervalo de confiança de 95% (n=9) (one-way ANOVA). A fluência de luz foi igual a 65,66 J/cm<sup>2</sup> (72,96 mW/cm<sup>2</sup>) em irradiação por LED de 660nm, com tempo de pré-incubação de 10 e irradiação por 900 segundos. Fonte: Autoria própria, 2022.

A avaliação da figura demonstrou que os grupos Luz e 3-AT não demonstraram redução bacteriana significativa, já os grupos TFDa e TC com inibição da catalase igual a 10 e 20 minutos apresentaram redução significativa quando comparada ao grupo CC.

Entretanto, pensando na definição de sinergismo, foi avaliado a diferença entre as reduções bacterianas dos grupos TFDa e TC e não houve diferença estatística entre as mesmas.

Com isso, o tempo de inibição da catalase de 30 minutos foi testado, visando avaliar se há aumento da diferença estatística da morte celular entre os grupos TFDa e TC.

Com um tempo de inibição da catalase igual a 30 minutos a avaliação estatística demonstrou diferença significativa entre a redução bacteriana dos grupos TFDa e TC, com redução de 0,72 Log<sub>10</sub> UFC/mL maior para o grupo TC.

Somente esse dado já demonstrava que a TC mediada por AM já possuía sinergismo, contanto que a suspensão bacteriana ficasse em contato com o inibidor no mínimo 30 minutos, mas foi decidido avaliar mais um tempo de inibição da catalase, 40 minutos.

O tempo de inibição da catalase igual a 40 minutos trouxe resultados surpreendentes, com redução total do Log<sub>10</sub> de UFC/mL. Na tabela 7 estão demonstradas as reduções bacteriana obtidas nos diferentes tempos de inibição avaliados, para os grupos TFDa e TC.

Tabela 7. Redução bacteriana pós Terapia Combinada mediada por Azul de Metileno nos diferentes tempos de inibição da catalase

| <b>Tempo de Inibição da Catalase (minutos)</b> | <b>Redução TFDa (log<sub>10</sub> UFC/mL)</b> | <b>Redução TC (log<sub>10</sub> UFC/mL)</b> |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 10                                             | 0,47                                          | 1,03                                        |
| 20                                             | 1,18                                          | 0,74                                        |
| 30                                             | 1,43                                          | 2,15                                        |
| 40                                             | 1,36                                          | 6,01                                        |

A tabela representa a redução bacteriana (em log<sub>10</sub> UFC/mL) após tratamento com terapia combinada mediada por Azul de Metileno (50 µg/mL) solubilizado em salina estéril nos diferentes tempos de inibição da catalase (10 – 40 minutos) pelo 3-AT (10 µg/mL). Fonte: Autoria própria, 2022.

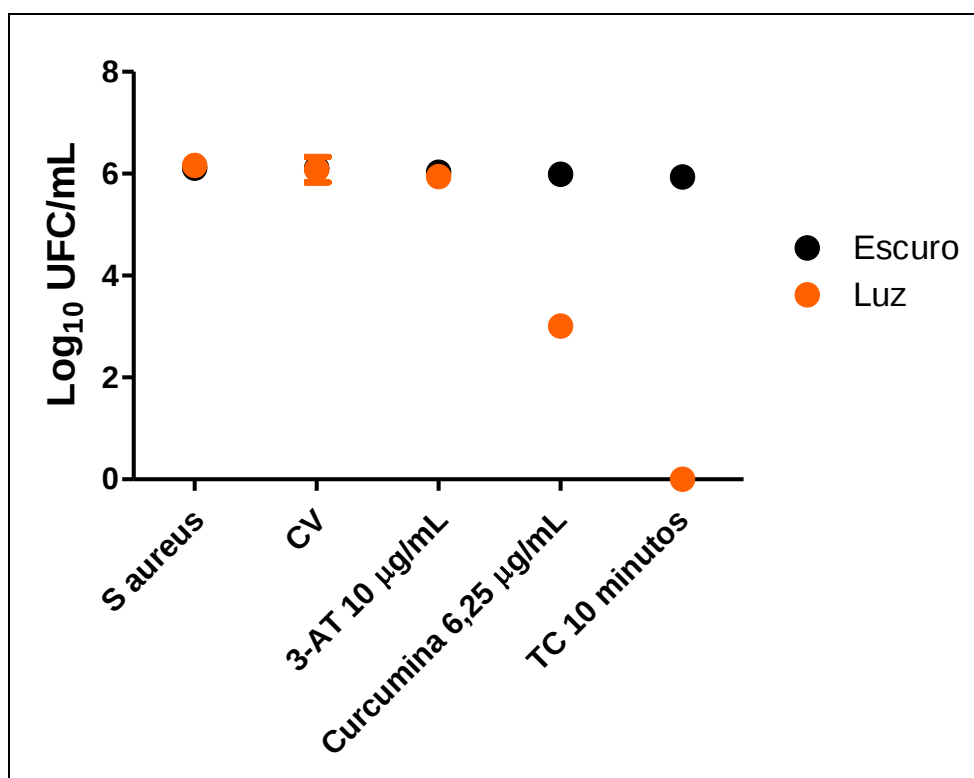
É possível ver que o tempo de inibição da catalase e o resultados de redução bacteriana foram diretamente proporcionais, chegando ao ápice em 40 minutos, que obteve redução maior do que 4 vezes a obtida pelo grupo TFDa, com redução total do Log<sub>10</sub> de UFC/mL

Isso confirma os resultados anteriores e mostra que a suspensão bacteriana precisa ficar 40 minutos em contato com o 3-AT antes da adição do AM para a obtenção de melhores resultados.

Além disso, a comparação dos resultados da TFDa e da TC mediada por AM com período de inibição da catalase de 20 minutos demonstrou que a TC foi menos eficiente que a TFDa.

Uma vez concluída a parte de TC mediada por AM, iniciou-se as avaliações da TC mediada por CUR com primeiro a adição do 3-AT, seguido da adição da CUR. A figura 23 demonstra a avaliação da toxicidade no escuro e após irradiação por fluência de 25 J/cm<sup>2</sup> (55 mW/cm<sup>2</sup>) por LED 460 nm da CUR 6,25 µg/mL e do 3-AT 10 µg/mL no tempo de inibição da catalase igual a 10 minutos.

Figura 23. Avaliação da toxicidade da Curcumina (6,25 µg/mL) e do 3-AT (10 µg/mL) na ausência e na presença de irradiação, primeiro com a adição do 3-AT seguido da adição da Curcumina



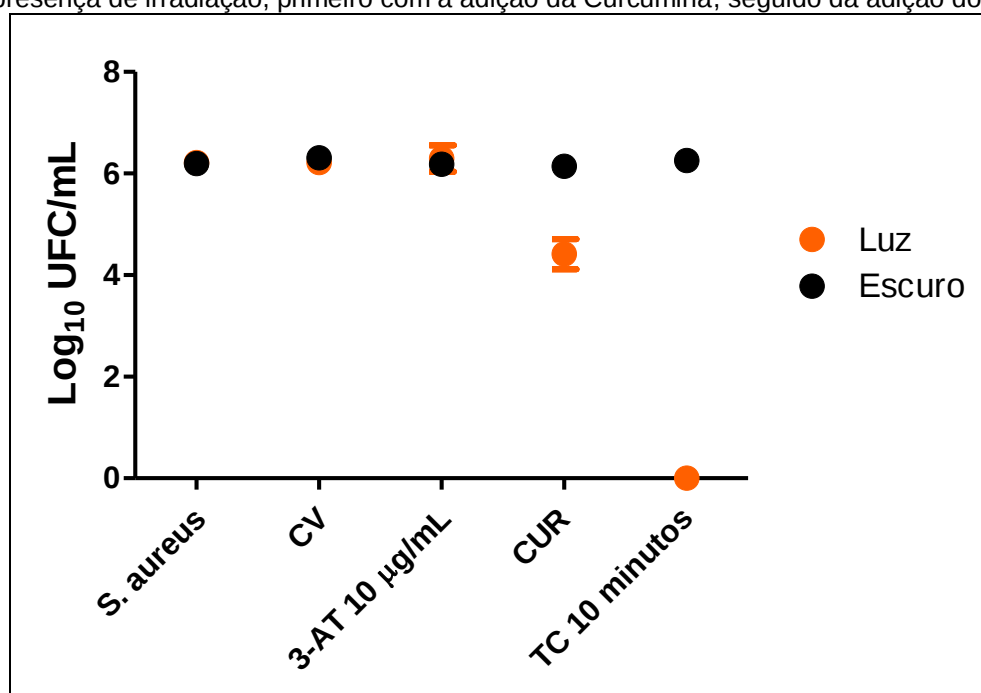
O gráfico representa a avaliação da toxicidade no escuro e após irradiação da terapia combinada mediada por Curcumina (6,25 µg/mL) dissolvida em DMSO 1% e sacarose 0,5% no tempo de inibição da catalase igual a 10 minutos. Os círculos representam os valores médios de log<sub>10</sub> entre os grupos controle de crescimento (CC), controle de veículo (CV), curcumina 6,25 µg/mL, 3-AT 10 µg/mL e terapia combinada mediada por curcumina 6,25 µg/mL de três experimentos independentes e as barras representam o intervalo de confiança de 95% (n=9) (two-way ANOVA). Para avaliação no escuro, as amostras foram deixadas no escuro e em temperatura ambiente pelos tempos de inibição, pré-incubação e irradiação; já para avaliação da susceptibilidade bacteriana após irradiação, as amostras foram deixadas no escuro pelo período de inibição e pré-irradiação, sendo irradiadas após por LED 460 nm, fluência de 25 J/cm<sup>2</sup> (55 mW/cm<sup>2</sup>). Fonte: Autoria própria, 2021.

No gráfico estão representados os *S. aureus*, controle de veículo (CV), CUR 6,25 µg/mL, 3-AT 10 µg/mL e TC. Assim como na avaliação da toxicidade no escuro da TC mediada por AM, os grupos avaliados não demonstraram diferença significativa em relação ao grupo CC.

Os grupos CV, Luz e 3-AT 10 µg/mL não demonstraram redução bacteriana significativa e grupo TFDa obteve redução próxima a 3 Log<sub>10</sub> UFC/mL, reforçando os dados de experimentos anteriores. Já o grupo TC, com apenas 10 minutos de tempo de inibição da catalase, obteve redução total (6,1 Log<sub>10</sub> UFC/mL).

Surgiu, então, a dúvida do que aconteceria caso a CUR fosse adicionada antes do 3-AT. A figura 24 demonstra a avaliação da toxicidade no escuro e após irradiação por fluência de 25 J/cm<sup>2</sup> (55 mW/cm<sup>2</sup>) por LED 460 nm da CUR 6,25 µg/mL e do 3-AT 10 µg/mL no tempo de inibição da catalase igual a 10 minutos, primeiro com a adição da CUR e depois com a adição do 3-AT.

Figura 24. Avaliação da toxicidade da Curcumina (6,25 µg/mL) e do 3-AT (10 µg/mL) na ausência e na presença de irradiação, primeiro com a adição da Curcumina, seguido da adição do 3-AT



O gráfico representa a avaliação da toxicidade no escuro e após irradiação da terapia combinada mediada por Curcumina (6,25 µg/mL) dissolvida em DMSO 1% e sacarose 0,5% no tempo de inibição da catalase igual a 10 minutos. Os círculos representam os valores médios de log<sub>10</sub> entre os grupos controle de crescimento (CC), controle de veículo (CV), curcumina 6,25 µg/mL, 3-AT 10 µg/mL e terapia combinada mediada por curcumina 6,25 µg/mL de três experimentos independentes e as barras representam o intervalo de confiança de 95% (n=9) (two-way ANOVA). Para avaliação no escuro, as amostras foram deixadas no escuro e em temperatura ambiente pelos tempos de inibição, pré-incubação e irradiação; já para avaliação da susceptibilidade bacteriana após irradiação, as amostras foram deixadas no escuro pelo período de inibição e pré-irradiação, sendo irradiadas após por LED 460 nm, fluência de 25 J/cm<sup>2</sup> (55 mW/cm<sup>2</sup>). Fonte: Autoria própria, 2021.

É possível observar que a figura 24 demonstrou o mesmo padrão da figura 23, demonstrando que, em relação à TC mediada por CUR, a ordem de adição do inibidor

de catalase e da CUR não impactou o resultado final de redução bacteriana total com 10 minutos de período de inibição da catalase.

A avaliação inicial dos resultados pode parecer discrepante do obtido com a TC mediada por AM, já que tal tratamento precisou de 40 minutos de inibição para obter o mesmo resultado, o que leva a crer que a TC mediada por CUR é muito mais eficiente.

Entretanto, ao analisar os tempos de pré-irradiação de ambos os FSs, é possível chegar a outra conclusão: o tempo de pré-incubação do AM é de 10 minutos, já o da CUR é de 30 minutos.

Ao somar o tempo de inibição da catalase com o tempo de pré-irradiação para cada FS, obtemos um período de pré-tratamento total de 50 minutos para o AM e de 40 minutos para a CUR. Com isso, pode-se concluir que ambos as TC possuíram aproximadamente o mesmo tempo de pré-tratamento e, portanto, tiveram a mesma eficácia.

Pode-se concluir também que foi necessário um tempo de pré-tratamento de no mínimo 40 minutos para obter redução total do  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL da suspensão de *S. aureus*.

Além disso, é válido comparar a eficiência quântica para a produção de  $^1\text{O}_2$  para cada FS com a atividade da catalase.

Em geral, FS pouco hidrossolúveis, como a CUR, tendem a se agregar em solução, o que neutraliza o potencial fototóxico e penetração em células bacterianas, gerando baixos rendimentos quânticos de  $^1\text{O}_2$  (KONAN; GURNY; ALLÉMAN, 2002; SEIDI DAMYEH et al., 2020). Com isso, podemos supor que a eficiência quântica para a produção de  $^1\text{O}_2$  da CUR é menor que a do AM e que uma menor produção de  $^1\text{O}_2$  necessitaria de menor atividade da catalase, sendo necessário um menor tempo de inibição pelo 3-AT para extinguir essa atividade e aumentar o efeito dos poucos  $^1\text{O}_2$  produzidos pela CUR; o oposto também seria verdadeiro: como o AM tem maior produção  $^1\text{O}_2$ , seria necessário de maior atividade catalítica para suprir a ação dessa ERO, fazendo com que seja necessário um maior tempo de inibição da catalase pelo 3-AT para neutralizar essa atividade.

A aplicação desse estudo vai de encontro direto com o de Tomb et al. (2017), que demonstraram que MSSA cultivadas em exposição à luz violeta-azul antimicrobiana (comprimento de onda de 405 nm; 1 mW/cm<sup>2</sup>; 108 J/cm<sup>2</sup>) demonstraram maior tolerância à irradiação do que culturas cultivadas no escuro,

sugerindo que exposição à luz de baixa taxa de fluência de 405 nm durante a cultura pode ter agido como um estressor de baixo nível durante o crescimento, levando ao aumento de regulação das respostas ao estresse oxidativo. Tal achado demonstra a possibilidade de aumento na expressão de enzimas protetoras, por exemplo levando ao aumento da quantidade de catalase (TOMB et al., 2017).

Tais achados corroboram com os experimentos de Dosseli et al. (2012), que demonstrou um aumento de catalase após inativação fotodinâmica com luz azul em *S. aureus*, levando a crer que esta enzima é regulada para tentar ajudar a proteger as bactérias contra o estresse oxidativo (DOSSELLI et al., 2012; TOMB et al., 2017).

Além disso, até o momento não foram encontrados relatos na literatura que utilizem a abordagem utilizada nesse estudo. Dois artigos podem se aproximar, sendo o primeiro demonstrando o impacto do 3-AT na catalase peroxisomal em cepas de *Candida tropicalis in vivo*, mas o mesmo não aplica a TFDa (UEDA et al., 2003); e o outro usa uma estrutura derivada do 3-AT na TFDa (LIU et al., 2021).

## 5. CONCLUSÕES

Tendo em vista os dados apresentados, é possível concluir o 3-AT promoveu redução do crescimento bacteriano, não levou à morte bacteriana e os parâmetros de fluência sub-letal para TFDa mediada tanto por AM quando por CUR foram padronizados com sucesso. Quanto à TC mediada por AM e por CUR, o sinergismo entre TFDa e 3-AT foi comprovado e, mesmo que tempo de inibição da catalase sejam diferentes, ambos apresentaram aproximadamente o mesmo tempo de pré-tratamento e a mesma eficácia.

Também é possível concluir que a terapia combinada mediada tanto por AM quanto por CUR tem grande potencial de aplicação em estudos mais complexos, podendo chegar até a ser utilizado no tratamento de infecções por *S. aureus*.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S. et al. Antioxidant effects of curcumin in models of neurodegeneration, aging, oxidative and nitrosative stress: A review. **Neuroscience**, v. 406, p. 1–21, 2019.
- ADJALLEY, S. H. et al. Quantitative assessment of Plasmodium falciparum sexual development reveals potent transmission-blocking activity by methylene blue. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 47, p. E1214–E1223, 2011.
- AGERER, F. et al. Cellular invasion by Staphylococcus aureus reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalisation. **Journal of cell science**, v. 118, n. 10, p. 2189–2200, 2005.
- AGGARWAL, B. B.; KUMAR, A.; BHARTI, A. C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. **Anticancer research**, v. 23, n. 1/A, p. 363–398, 2003.
- AKHTAR DANESH, L. et al. Elimination of Staphylococcus aureus nasal carriage in intensive care patients lowers infection rates. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 333–338, fev. 2020.
- ALGHADEER, S. et al. Self-medication with Antibiotics in Saudi Arabia. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, 1 fev. 2018.
- ALVES, E. et al. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 70, 2009.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. suppl\_1, p. 5–16, 1 jul. 2001.
- ARSHAD, L. et al. Immunosuppressive Effects of Natural  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Carbonyl-Based Compounds, and Their Analogs and Derivatives, on Immune Cells: A Review. **Frontiers in Pharmacology**, 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2017.00022>>
- AURELIANO, D. P. et al. Cell death mechanisms in Leishmania amazonensis triggered by methylene blue-mediated antiparasitic photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 23, p. 1–8, 2018.
- BANERJEE, O. et al. Inhibition of catalase activity with 3-amino-1,2,4-triazole intensifies bisphenol A (BPA)-induced toxicity in granulosa cells of female albino rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 34, n. 11, p. 787–797, 1 out. 2018.
- BANSAL, S. S. et al. Advanced Drug Delivery Systems of Curcumin for Cancer Chemoprevention. **Cancer Prevention Research**, v. 4, n. 8, p. 1158–1171, 3 ago.

2011.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>.

BAYLES, K. W. et al. Intracellular Staphylococcus aureus escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 66, n. 1, p. 336–342, 1998.

BONG, P.-H. Spectral and Photophysical Behaviors of Curcumin and Curcuminoids. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 21, n. 1, p. 81–86, 2000.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.

CABRAL, F. V et al. Preclinical Investigation of Methylene Blue-mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy on Leishmania Parasites Using Real-Time Bioluminescence. **Photochemistry and Photobiology**, v. 96, n. 3, p. 604–610, 1 maio 2020.

CALIXTO, G. et al. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. **Molecules**, v. 21, p. 342, 11 mar. 2016.

CAMPOS, L. et al. Antimicrobial photodynamic therapy to oral candidiasis not responsive to micafungin in a patient undergoing hematopoietic cell transplantation. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 34, p. 102296, 2021.

CARRAHER JR, C. E. et al. Polyamines from reaction of organotin dihalides and 3-amino-1, 2, 4-triazole (3-AT)-synthesis and ability to inhibit human cancer cell lines. **WJPR**, v. 8, n. 10, p. 39–58, 2019.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279–293, 2004.

CHANG, J. Y.; SCHROEDER, W. A. Reaction of 3-amino-1: 2: 4-triazole with bovine liver catalase and human erythrocyte catalase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 148, n. 2, p. 505–508, 1972.

CHIGNELL, C. F. et al. SPECTRAL AND PHOTOCHEMICAL PROPERTIES OF CURCUMIN. **Photochemistry and Photobiology**, v. 59, n. 3, p. 295–302, 1 mar. 1994.

CLATWORTHY, A. E.; PIERSON, E.; HUNG, D. T. Targeting virulence: A new paradigm for antimicrobial therapy. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 9, p. 541–548, 2007.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution**

**Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically: approved standard.** 9th. ed. Wayne: CLSI, 2012.

DA COLLINA, G. A. et al. Controlling methylene blue aggregation: a more efficient alternative to treat *Candida albicans* infections using photodynamic therapy. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1355–1364, 2018.

DA SILVA, M. C. A. et al. Dynamic interaction between airway epithelial cells and *Staphylococcus aureus*. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 287, n. 3, p. L543–L551, 2004.

DE AGUIAR COLETTI, T. M. S. F. et al. Optimization of Antimicrobial Photodynamic Therapy in Biofilms by Inhibiting Efflux Pump. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 35, n. 7, p. 378–385, 15 jun. 2017.

DE ANNUNZIO, S. R. et al. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* and *Propionibacterium acnes* to antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 178, p. 545–550, jan. 2018.

DEAN, J. C. et al. Methylene Blue Exciton States Steer Nonradiative Relaxation: Ultrafast Spectroscopy of Methylene Blue Dimer. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, n. 3, p. 440–454, 28 jan. 2016.

DEL'ALAMO, L. et al. An outbreak of catalase-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Hospital Infection**, v. 65, n. 3, p. 226–230, 2007.

DIAS, L. D. et al. Curcumin as a photosensitizer: From molecular structure to recent advances in antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 45, p. 100384, 2020.

DOSSELLI, R. et al. Molecular targets of antimicrobial photodynamic therapy identified by a proteomic approach. **Journal of Proteomics**, v. 77, p. 329–343, 2012.

DZIEWANOWSKA, K. et al. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 67, n. 9, p. 4673–4678, 1999.

ETIENNE, J. Panton-Valentine leukocidin: a marker of severity for *Staphylococcus aureus* infection? **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 5, p. 591–593, 2005.

FERREIRA, J. et al. Photostability of different chlorine photosensitizers. **Laser Physics Letters**, v. 5, n. 2, p. 156–161, 1 fev. 2008.

FITA, I.; ROSSMANN, M. G. The active center of catalase. **Journal of Molecular Biology**, v. 185, n. 1, p. 21–37, 1985.

FOWLER, T. et al. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell  $\beta 1$  integrins. **European journal of cell biology**, v. 79, n. 10, p. 672–679, 2000.

FOWLER, T. et al. Src kinase has a central role in in vitro cellular internalization of *Staphylococcus aureus*. **Cellular microbiology**, v. 5, n. 6, p. 417–426, 2003.

GERALDE, M. C. et al. Study on the incubation time of curcumin in photodynamic therapy. In: Advanced School on Modern Trends of Biophotonics for Diagnosis and Treatment of Cancer and Microbial Control. **Anais...** São Carlos: Instituto de Física de São Carlos, 2013.

GUDIÑA, E. J. et al. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 419–424, 1 abr. 2010.

HALLIWELL, B. The Chemistry of Free Radicals. **Toxicology and Industrial Health**, v. 9, n. 1–2, p. 1–21, 30 jan. 1993.

HAOUZI, P. et al. Revisiting the physiological effects of methylene blue as a treatment of cyanide intoxication. **Clinical Toxicology**, v. 56, n. 9, p. 828–840, 2018.

HEIM, W. G.; APPLEMAN, D.; PYFROM, H. T. Effects of 3-Amino-1,2,4-Triazole (AT) on Catalase and Other Compounds. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 186, n. 1, p. 19–23, 1 jul. 1956.

HESS, D. J. et al. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* within cultured enterocytes. **Journal of Surgical Research**, v. 114, n. 1, p. 42–49, 2003.

JONAS, D. et al. Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation. **Infection and immunity**, v. 62, n. 4, p. 1304–1312, 1994.

KARIMNIA, V.; SLACK, F. J.; CELLI, J. P. Photodynamic Therapy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cancers. **Cancers** (Basel). v. 13, n. 17, p. 4354, Aug. 28, 2021. doi: 10.3390/cancers13174354.

KASIM, N. A. et al. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. **Molecular pharmaceutics**, v. 1, n. 1, p. 85–96, 2004.

KAUR, R. et al. Recent developments on 1,2,4-triazole nucleus in anticancer compounds: A review. **Anticancer Agents Med Chem**. v. 16, p. 465–489, 1 abr. 2016.

KHOLIMATUSSA'DIAH, S.; DYAH ASTUTI, S.; APSARI, R. Determination of Infrared Laser Energy Dose for Cancer Cells Inactivation as a Candidate of Photodynamic Therapy. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1445, n. 1, p. 12021, 2020.

KHURANA, A.; HO, C.-T. High performance liquid chromatographic analysis of curcuminoids and their photo-oxidative decomposition compounds in *Curcuma longa* L. **Journal of liquid chromatography**, v. 11, n. 11, p. 2295–2304, 1988.

KLOSOWSKI, E. M. et al. The photodynamic and direct actions of methylene blue on mitochondrial energy metabolism: A balance of the useful and harmful effects of this photosensitizer. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 153, p. 34–53, 2020.

KNAPP, C.; MOODY, J. Tests to assess bactericidal activity. Part 2. Time-kill assay. In: HD, I. (Ed.). . **Clinical microbiology procedures handbook**. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992.

KOLEV, T. M. et al. DFT and experimental studies of the structure and vibrational spectra of curcumin. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 102, n. 6, p. 1069–1079, 1 jan. 2005.

KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 66, n. 2, p. 89–106, 2002.

KRAFTS, K.; HEMPELMANN, E.; SKÓRSKA-STANIA, A. From methylene blue to chloroquine: a brief review of the development of an antimalarial therapy. **Parasitology research**, v. 111, n. 1, p. 1–6, 2012.

KUSTOV, A. V et al. Transurethral Resection of Non-Muscle Invasive Bladder Tumors Combined with Fluorescence Diagnosis and Photodynamic Therapy with Chlorin e6-Type Photosensitizers. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 1, 233, 2022.

KWIATKOWSKI, S. et al. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1098–1107, 2018.

LIEBERMAN, M.; MARKS, A. Oxygen Toxicity and Free Radical Injury. In: **Basic Medical Biochemistry. A clinical approach**. 4th. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams&Wilkins, 2013. v. 4.

LIN, J. et al. Photocatalytic degradation of methylene blue in aqueous solution by using ZnO-SnO<sub>2</sub> nanocomposites. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 87, p. 24–31, 2018.

LIU, X. et al. 3-Amino-1,2,4-triazole-derived graphitic carbon nitride for photodynamic therapy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 250, p. 119363, 2021.

LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77–84, 2016.

LOWY, F. D. et al. Staphylococcus aureus-human endothelial cell interactions. **Journal of ultrastructure and molecular structure research**, v. 98, n. 2, p. 137–146, 1988.

MACKAY, A. M. The evolution of clinical guidelines for antimicrobial photodynamic therapy of skin. **Photochemical & Photobiological Sciences**, 2022.

- MANSOURI, A.; LURIE, A. A. Methemoglobinemia. **American Journal of Hematology**, v. 42, n. 1, p. 7–12, 1 jan. 1993.
- MARGOLIASH, E.; NOVOGRODSKY, A. A study of the inhibition of catalase by 3-amino-1:2:4-triazole. **The Biochemical journal**, v. 68, n. 3, p. 468–475, mar. 1958.
- MARGOLIASH, E.; NOVOGRODSKY, A.; SCHEJTER, A. Irreversible reaction of 3-amino-1:2:4-triazole and related inhibitors with the protein of catalase. **Biochemical Journal**, v. 74, n. 2, p. 339–348, 1 fev. 1960.
- MCDUGAL, L. K. et al. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5113–5120, 2003.
- MELO, J. O. F. et al. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 569–579, jun. 2006.
- MENZIES, B. E.; KOURTEVA, I. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. **Infection and immunity**, v. 66, n. 12, p. 5994–5998, 1998.
- MILTON, N. G. N. Inhibition of Catalase Activity with 3-Amino-Triazole Enhances the Cytotoxicity of the Alzheimer's Amyloid- $\beta$  Peptide. **NeuroToxicology**, v. 22, n. 6, p. 767–774, 2001.
- MONDAL, S.; GHOSH, S.; MOULIK, S. P. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV–visible and steady-state fluorescence spectral study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 158, p. 212–218, 2016.
- MONDAL, S.; REYES, M. E. D. A.; PAL, U. Plasmon induced enhanced photocatalytic activity of gold loaded hydroxyapatite nanoparticles for methylene blue degradation under visible light. **RSC advances**, v. 7, n. 14, p. 8633–8645, 2017.
- MOOSMANN, B. et al. Protective activity of aromatic amines and imines against oxidative nerve cell death. 2001.
- NADLER, V.; GOLDBERG, I.; HOCHMAN, A. Comparative study of bacterial catalases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 882, n. 2, p. 234–241, 1986.
- NAIR, S. P. et al. The  $\sigma$ B regulon influences internalization of *Staphylococcus aureus* by osteoblasts. **Infection and immunity**, v. 71, n. 7, p. 4167–4170, 2003.
- NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27986–28006, 2015.
- NOUWEN, J. L. et al. Persistent (not intermittent) nasal carriage of *Staphylococcus*

aureus is the determinant of CPD-related infections. **Kidney International**, v. 67, n. 3, p. 1084–1092, 2005.

NUZZO, I. et al. Apoptosis of human keratinocytes after bacterial invasion. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 235–240, 2000.

OLIVEIRA, C. S. et al. Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 4, p. 824–833, 2011.

OMS. **WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance**.

Disponível em:

<[https://www.who.int/drugresistance/WHO\\_Global\\_Strategy\\_English.pdf](https://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy_English.pdf)>.

PAN, M.-H.; HUANG, T.-M.; LIN, J.-K. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. **Drug metabolism and disposition**, v. 27, n. 4, p. 486–494, 1999.

PARASURAMAN, P. et al. Synthesis and antimicrobial photodynamic effect of methylene blue conjugated carbon nanotubes on *E. coli* and *S. aureus*. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 18, n. 2, p. 563–576, 2019.

PAZIANI, M. H. et al. Antimicrobial photodynamic therapy with phenothiazinium photosensitizers in non-vertebrate model *Galleria mellonella* infected with *Fusarium keratoplasticum* and *Fusarium moniliforme*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 25, p. 197–203, 2019.

PEACOCK, S. J. et al. Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. **Microbiology**, v. 145, n. 12, p. 3477–3486, 1999.

PETRUS, E. M. et al. A study on the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of Nano Colloidal Silver on food-borne pathogens. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 1, 2011.

PLECH, T. et al. Search for factors affecting antibacterial activity and toxicity of 1, 2, 4-triazole-ciprofloxacin hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 94–103, 2015a.

PLECH, T. et al. Determination of the primary molecular target of 1, 2, 4-triazole-ciprofloxacin hybrids. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6254–6272, 2015b.

PORRO, C. et al. **Curcumin Regulates Anti-Inflammatory Responses by JAK/STAT/SOCS Signaling Pathway in BV-2 Microglial Cells** *Biology*, 2019.

RANG, H. P. et al. Princípios básicos da quimioterapia antimicrobiana. In: **Farmacologia de Rang & Dale**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RAPACKA-ZDONCZYK, A. et al. Development of *Staphylococcus aureus* tolerance to antimicrobial photodynamic inactivation and antimicrobial blue light upon sub-lethal treatment. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 9423, 2019.

REHM, S. J.; TICE, A. Staphylococcus aureus: Methicillin-Susceptible S. aureus to Methicillin-Resistant S. aureus and Vancomycin-Resistant S. aureus. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. Supplement\_2, p. S176–S182, 15 set. 2010.

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

SAEED, K.; KHAN, I.; PARK, S.-Y. TiO<sub>2</sub>/amidoxime-modified polyacrylonitrile nanofibers and its application for the photodegradation of methyl blue in aqueous medium. **Desalination and Water Treatment**, v. 54, n. 11, p. 3146–3151, 2015.

SAMPAIO, L. S. et al. Influence of light intensity and irradiation mode on methylene blue, chlorin-e6 and curcumin-mediated photodynamic therapy against Enterococcus faecalis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, p. 101925, set. 2020.

SCHIRMER, R. H. et al. “Lest we forget you — methylene blue ...”. **Neurobiology of Aging**, v. 32, n. 12, p. 2325.e7-2325.e16, 2011.

SCHNAITH, A. et al. Staphylococcus aureus subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 4, p. 2695–2706, 2007.

SEIDI DAMYEH, M. et al. An insight into curcumin-based photosensitization as a promising and green food preservation technology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 1727–1759, 1 jul. 2020.

SEPASI TEHRANI, H.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Catalase and its mysteries. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 140, p. 5–12, 2018.

SHARMA, R. A.; GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P. Curcumin: The story so far. **European Journal of Cancer**, v. 41, n. 13, p. 1955–1968, 1 set. 2005.

SINGH, R.; SINGH, S. Redox-dependent catalase mimetic cerium oxide-based nanozyme protect human hepatic cells from 3-AT induced acatalasemia. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 625–635, 2019.

SINGH, S. V et al. Mechanism of inhibition of benzo [a] pyrene-induced forestomach cancer in mice by dietary curcumin. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 8, p. 1357–1360, 1998.

SINHA, B. et al. Fibronectin-binding protein acts as Staphylococcus aureus invasin via fibronectin bridging to integrin  $\alpha 5\beta 1$ . **Cellular microbiology**, v. 1, n. 2, p. 101–117, 1999.

SUN, K. et al. Enhanced highly toxic reactive oxygen species levels from iron oxide core–shell mesoporous silica nanocarrier-mediated Fenton reactions for cancer therapy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 6, n. 37, p. 5876–5887, 2018.

TIBURCIO, M. A. et al. In vitro evaluation of the cis-[Ru(phen)<sub>2</sub>(pPDIp)]<sup>2+\*</sup> complex for antimicrobial photodynamic therapy against *Sporothrix brasiliensis* and *Candida albicans*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 229, p. 112414, 2022.

TICHACZEK-GOSKA, D.; GLEŃSK, M.; WOJNICZ, D. The Enhancement of the Photodynamic Therapy and Ciprofloxacin Activity against Uropathogenic *Escherichia coli* Strains by *Polypodium vulgare* Rhizome Aqueous Extract. **Pathogens**, 2021.

TIGANOVA, I. G. et al. On the possibility of photodynamic inactivation of tracheobronchial tree pathogenic microbiota using methylene blue (in vitro study). **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 38, p. 102753, 2022.

TOMB, R. M. et al. Assessment of the potential for resistance to antimicrobial violet-blue light in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 100, 2017.

TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, jul. 2015.

TORTAMANO, A. C. A. C. et al. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by methylene blue in surfactant vehicle on periodontopathogens. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, p. 101784, 2020.

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

TOSATO, M. G. et al. Synergistic effect of carboxypterin and methylene blue applied to antimicrobial photodynamic therapy against mature biofilm of *Klebsiella pneumoniae*. **Heliyon**, v. 6, n. 3, e03522, 2020.

UEDA, M. et al. Effect of catalase-specific inhibitor 3-amino-1,2,4-triazole on yeast peroxisomal catalase in vivo. **FEMS Microbiology Letters**, v. 219, n. 1, p. 93–98, 1 fev. 2003.

VAN ONSELEN, R.; DOWNING, T. G. β-N-methylamino-L-alanine Inhibits Human Catalase Activity: Possible Implications for Neurodegenerative Disease Development. **International Journal of Toxicology**, v. 38, n. 2, p. 129–134, 20 jan. 2019.

WAINWRIGHT, M.; AMARAL, L. The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs. **Tropical Medicine & International Health**, v. 10, n. 6, p. 501–511, 2005.

WAINWRIGHT, M.; CROSSLEY, K. B. Methylene Blue - a Therapeutic Dye for All Seasons? **Journal of Chemotherapy**, v. 14, n. 5, p. 431–443, 1 jan. 2002.

WERTHEIM, H. F. L. et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, p. 751–762, 1

dez. 2005.

WHITE, A. Increased Infection Rates in Heavy Nasal Carriers of Coagulase-Positive Staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 161, p. 667-670, 1963.

WIKENE, K. O.; BRUZELL, E.; TØNNESEN, H. H. Characterization and antimicrobial phototoxicity of curcumin dissolved in natural deep eutectic solvents. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, p. 26–32, 2015.

YANG, C. et al. Highly efficient photocatalytic degradation of methylene blue by P2ABSA-modified TiO<sub>2</sub> nanocomposite due to the photosensitization synergetic effect of TiO<sub>2</sub> and P2ABSA. **RSC advances**, v. 7, n. 38, p. 23699–23708, 2017.

YOON, I.; LI, J. Z.; SHIM, Y. K. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. **Clinical endoscopy**, v. 46, n. 1, p. 7–23, jan. 2013.

YU, N. et al. Dermabrasion combined with photodynamic therapy: a new option for the treatment of non-melanoma skin cancer. **Lasers in Medical Science**, v. 37, n. 2, p. 1255-1263, 2021.

ZAGO, L. H. DE P. et al. Antimicrobial photodynamic therapy against metronidazole-resistant dental plaque bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 209, p. 111903, 2020.

ZHANG, M. et al. Anti-inflammatory activity of curcumin-loaded tetrahedral framework nucleic acids on acute gouty arthritis. **Bioactive Materials**, v. 8, p. 368–380, 2022.