



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**LÍVIA MARA ALVES FIGUEIREDO GODOI**

**EFEITOS DO FOTOENTICINE, AZUL DE METILENO E FARNESOL  
NA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA PARA CONTROLE  
DE *Acinetobacter baumannii***

2021

**LÍVIA MARA ALVES FIGUEIREDO GODOI**

**EFEITOS DO FOTOENTICINE, AZUL DE METILENO E FARNESOL NA TERAPIA  
FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA PARA CONTROLE DE *Acinetobacter*  
*baumannii***

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Microbiologia / Imunologia. Linha de pesquisa: Doenças infecciosas de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2021

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2021]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Godoi, Livia Mara Alves Figueiredo

Efeitos do fotoentocine, azul de metileno e farnesol na terapia fotodinâmica antimicrobiana para controle de *Acinetobacter baumannii* / Livia Mara Alves Figueiredo Godoi. - São José dos Campos : [s.n.], 2021.  
79 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2021.

Orientadora: Juliana Campos Junqueira.

1. *Acinetobacter baumannii*. 2. Terapia fotodinâmica. 3. Fotossensibilizadores. 4. Queimaduras. I. Junqueira, Juliana Campos, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira** (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

**Profa. Dra. Juliana Ferreira Strixino**

Universidade do Vale do Paraíba (Univap)

Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D)

Campus São José dos Campos

**Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

**Prof. Assistente Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Faculdade de Odontologia

Campus de Araraquara

**Dra. Fernanda Freire**

Cambridge University Hospitals

Addenbrooke's Hospital

Cambridge

São José dos Campos, 30 de abril de 2021.

## DEDICATÓRIA

*À minha amada avó materna, **María Aparecida da Conceição Moraes** (in memoriam) vó Dica, por todo o amor, carinho e apoio dedicados a mim. Fonte de inspiração para continuar a busca pelos meus sonhos.*

*Aos meus amados pais, **María Aparecida Alves Figueiredo** e **Edson Figueiredo**, que sempre com amor e carinho me ensinaram a seguir em frente mostrando que sou capaz de conquistar meus objetivos. O incentivo e o suporte de vocês foram imprescindíveis para mais essa vitória.*

*Ao meu amado marido, **Julio Cesar Siqueira Souza Godói**, por me amar e apoiar, estando ao meu lado e segurando minha mão em todos os momentos dessa caminhada.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus por me proporcionar saúde para realizar esse trabalho e por me cercar de pessoas valorosas que contribuíram para tornar isso possível.*

*A Universidade Estadual Paulista do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos.*

*A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de Doutorado no período de 01/11/2017 a 31/05/2021.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa do projeto Universal, através do Processo nº 408369/2018-3.*

*A Universidade do Vale do Paraíba (Univap) pela parceria.*

*A Empresa Nuevas Tecnologías Científicas pela doação do fotossensibilizador Fotoenticine®.*

*Ao Laboratório Bioclín de São José dos Campos, pela doação das cepas clínicas de Acinetobacter baumannii.*

*Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pela cepa ATCC de A.*

baumannií.

*A Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira por me orientar nesse trabalho, sempre com muita dedicação, paciência e disponibilidade. Me orientando a buscar o melhor caminho, disposta a corrigir e incentivar sempre que necessário. Muito obrigada por construir esse trabalho ao meu lado.*

*A Profa. Dra. Juliana Ferreira Strixino por sua colaboração, orientação e disponibilidade, importantes para boa realização desse trabalho.*

*Aos participantes da Banca Examinadora Prof. Assistente Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima e Dra. Fernanda Freire pela participação e por toda contribuição necessária para melhora na qualidade desse trabalho*

*Ao programa de pós-graduação de Biopatologia Bucal, na pessoa da Coordenadora Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira. Obrigada por sua dedicação e contribuição sempre que possível.*

*Aos docentes do Programa de pós-graduação de Biopatologia Bucal, por toda a colaboração e conhecimento compartilhado.*

*Minha amada mãe, sempre zelando por mim, com muito amor, carinho e dedicação. Cuidando para que nada me faltasse, me amparando com muito carinho e me abençoando grandemente com suas orações. Mãe muito obrigada por tudo, eu te amo!*

*Meu amado pai, sempre disposto a me ouvir e aconselhar com muito carinho, dedicação e amor. Provendo o que fosse necessário para que eu pudesse conquistar meus objetivos, me dedicando as melhores conversas e abraços. Pai muito obrigada por tudo, eu te amo!*

*Meu amado esposo, Júlio, meu amor, ao longo de 17 anos sempre ao meu lado. Obrigada por me ouvir, me acolher quantas vezes fosse necessário. Obrigada por seguir ao meu lado compartilhando dessa conquista, doando seu tempo, sua amizade e seu amor. Obrigada pelo companheirismo, eu te amo!*

*Minha amada vizinha Dica (in memoriam), obrigada por ter sido luz na minha vida, com seu exemplo de força e amor. A senhora sempre estará viva em meu coração. Eu te amo!*

*Minha amada avó paterna Benedita Ramos Figueiredo (in memoriam), vó Dita, obrigada por compartilhar sua sabedoria, força e amor. Guardo a senhora em meu coração. Eu te amo!*

*Minha amada irmã Patrícia Helena Figueiredo e Silva, obrigada pela amizade, carinho e atenção. Obrigada por estar próxima a mim e disposta a me dar amor e me ouvir. Por sua torcida e ajuda sempre, você e mais que uma irmã, eu te amo!*

*Aos meus amados sobrinhos e afilhados Miguel Antonio Figueiredo e Silva e Giovanna Maia Godói, por trazerem tanto amor e alegria a minha vida. Os melhores presentes que pude ganhar. Amo vocês!*

*Meus amados sogros, Líliane Siqueira Souza Godói (in memoriam) e Valdir Godói, obrigada pelo carinho, acolhimento e toda a ajuda. Amo vocês!*

*Aos meus cunhados, Alex Sander Silva, Caio Cesar Siqueira Souza Godói, Marcela Lima Maia Godói, Augusto Cesar Siqueira Souza Godói e Pâmela Meibach, pela amizade e pelos momentos de alegria que pudemos compartilhar.*

*À minha amada família, tios, primos, madrinha, pelo companheirismo e por todo carinho.*

*A minha parceira de Laboratório Maira Terra Garcia, e a pos-doutoranda da Univap Juliana Guerra, por partilharem seu conhecimento e por toda a colaboração para realização desse trabalho.*

*A Vanessa Mecattii, Thais Cristine Pereira e Eliana Shimabukuro Cunha pela amizade, companheirismo e colaboração na pesquisa.*

*A todos meus amigos de Laboratório por todo o carinho e colaboração sem a qual esse trabalho não seria possível. Obrigada pela amizade e carinho.*

*Aos alunos de graduação Eliseu Gabriel Faustino e Jacqueline Maria Ferreira pela contribuição para o trabalho.*

*A Karen Cristina Kazue Yui pelo incentivo e indicação para o*

*início da carreira acadêmica.*

*Aos técnicos Sérgio Giovanny Alves e Domingos Gonçalves Pontes, pela colaboração durante o curso de Doutorado.*

*A todos que fazem parte da equipe da Biblioteca que contribuíram para elaboração desse trabalho e acesso ao material bibliográfico.*

*Aos funcionários da seção técnica de pós-graduação, Bruno Shiguemitsu Marques Tanaka, Carolina Lourenço Rei e Sandra Mara Cordeiro, pela disponibilidade, paciência no atendimento. Contribuindo para a minha formação no Doutorado.*

*E a todos os demais amigos da Unesp-ICT que contribuíram para minha trajetória e realização desse trabalho.*

*A minha amiga Francine Ribeiro Hirose pelo apoio e confiança, sempre disposta a ajudar com todo o carinho.*

*A todos meus amados amigos, que contribuíram para a realização desse capítulo especial da minha vida. Muito obrigada!*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	11
RESUMO .....	14
ABSTRACT .....	15
1 INTRODUÇÃO .....	16
2 PROPOSIÇÃO .....	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Cepas de <i>A. baumannii</i> .....	24
3.2 Preparo das suspensões padronizadas de <i>A. baumannii</i> .....	26
3.3 Fotossensibilizadores, fonte de luz e Farnesol .....	26
3.4 Distribuição dos grupos de estudo e delineamento experimental.....	27
3.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Farnesol .....	28
3.6 Estudo da TFDa sobre culturas planctônicas de <i>A. baumannii</i> .....	29
3.6.1 Análise da absorção dos fotossensibilizadores pelas células de <i>A. baumannii</i> (ATCC 19606) .....	30
3.6.2 Análise por Microscopia Confocal da internalização dos fotossensibilizadores pelas células de <i>A. baumannii</i> (ATCC 19606).....	31
3.6.3 Aplicação da TFDa sobre <i>A. baumannii</i> em culturas planctônicas.....	31
3.7 Estudo da TFDa sobre biofilmes de <i>A. baumannii</i> .....	34
3.7.1 Formação de biofilme de <i>A. baumannii</i> .....	34
3.7.2 Aplicação da TFDa sobre biofilme de <i>A. baumannii</i> .....	35
3.7.3 Análise por Microscopia Confocal da internalização dos fotossensibilizadores em células de <i>A. baumannii</i> (ATCC 19606) em biofilme	35
3.7.4 Teste de viabilidade celular por fluorescência em células da cepa ATCC de <i>A. baumannii</i> em biofilme .....	36
3.7.5 Análise dos efeitos da TFDa sobre os biofilmes de <i>A. baumannii</i> por meio da determinação do número de UFC/mL .....	36
3.8 Análise dos efeitos <i>in vivo</i> da TFDa em modelo de queimadura de <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>A. baumannii</i> (ATCC 19606) .....	37

3.8.1 Larvas de <i>G. mellonella</i> .....	37
3.8.2 Indução da queimadura e infecção em <i>G. mellonella</i> .....	37
3.8.3 Realização da TFDa em <i>G. mellonella</i> infectadas por <i>A. baumannii</i> .....	39
3.8.4 Curva de sobrevivência das larvas de <i>G. mellonella</i> .....	40
3.8.5 Índice de saúde das larvas de <i>G. mellonella</i> .....	40
3.9 Análise dos resultados obtidos .....	42
4 RESULTADO .....	43
4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana do Farnesol por meio do teste de CIM .....	43
4.2 Análise dos efeitos do Farnesol sobre a absorção do AM e FTC pelas células de <i>A. baumannii</i> (ATCC 19606) .....	44
4.3 Análise por Microscopia Confocal da internalização do AM e FTC pelas células de <i>A. baumannii</i> (ATCC 19606) .....	45
4.4 Estudo da TFDa em culturas planctônicas .....	46
4.4.1. Aplicação da TFDa com uso de Laser, AM, FTC e Farnesol sobre culturas planctônicas de <i>A. baumannii</i> .....	46
4.4.2 Aplicação da TFDa com uso de Led, AM e FTC sobre culturas planctônicas de <i>A. baumannii</i> .....	52
4.5 Estudo da TFDa em biofilmes .....	53
4.5.1 Análise por Microscopia Confocal da internalização dos fotossensibilizadores em células de <i>A. baumannii</i> (ATCC 19606) em biofilmes.....	53
4.5.2 Análise de viabilidade celular por fluorescência em Microscopia Confocal das células de <i>A. baumannii</i> (ATCC 19606) em biofilmes .....	55
4.5.3 Análise da contagem de UFC/mL de <i>A. baumannii</i> em biofilmes.....	58
4.6 Análise dos efeitos <i>in vivo</i> da TFDa sobre lesões de queimaduras em <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>A. baumannii</i> (ATCC 19606) .....	61
4.6.1 Curva de sobrevivência .....	62
4.6.2 Índice de saúde.....	64
5 DISCUSSÃO .....	67
6 CONCLUSÃO .....	73
REFERÊNCIAS.....	74

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de Jablonski modificado.....	19
Figura 2 - Placa de ágar MacConkey contendo crescimento de <i>A. baumannii</i> , caracterizado pela presença de colônias rosadas com aspecto cremoso.....	25
Figura 3 - Fluxograma com as etapas do projeto de pesquisa .....	28
Figura 4 - Laser aplicado sobre a placa de 96 poços com anteparo escuro .....	33
Figura 5 – Leds para aplicação na porção inferior da placa de 96 poços.....	33
Figura 6 - Crescimento de colônias de <i>A. baumannii</i> em meio de cultura ágar BHI, semeadas pela técnica da gota .....	34
Figura 7 – Metodologia de queimadura realizada no modelo experimental de <i>G. mellonella</i> .....	38
Figura 8 – Metodologia de infecção em lesão de queimadura no modelo de <i>G. mellonella</i> .....	39
Figura 9 – Aparência da larva após a infecção e sua pontuação no índice de saúde .....	41
Figura 10 - Placa de 96 poços para determinação da CIM do Farnesol.....	43
Figura 11 - Valores de absorbância (600 nm) indicando absorção do AM e do FTC pela membrana da célula de <i>A. baumannii</i> (ATCC 19606) .....	44
Figura 12 – Microscopia Confocal da internalização do AM pelas células bacterianas de <i>A. baumannii</i> (ATCC 19606) .....	45

Figura 13 – Microscopia Confocal da internalização do FTC pelas células bacterianas de <i>A. baumannii</i> (ATCC 19606) .....	46
Figura 14 – TFDa sobre culturas planctônicas de <i>A. baumannii</i> cepa ATCC (A) e cepa clínica A1 (B), utilizando-se AM como fotossensibilizador e Farnesol associado a terapia .....	48
Figura 15 – Médias e desvio-padrão de UFC/mL de <i>A. baumannii</i> no teste de toxicidade do FTC no escuro sobre culturas planctônicas .....	49
Figura 16 – Médias e desvio-padrão de UFC/mL de <i>A. baumannii</i> obtidos no teste com diferentes concentrações de FTC na TFDa .....	50
Figura 17 - Médias e desvio-padrão de UFC/mL do teste de TFDa sobre culturas planctônicas de <i>A. baumannii</i> cepa ATCC (A) e cepa clínica A1 (B), utilizando FTC como fotossensibilizador e Farnesol associado a terapia .....	51
Figura 18 - TFDa com Leds sobre culturas planctônicas de <i>A. baumannii</i> cepa ATCC, cepa clínica A1, A2 e A4, utilizando AM e FTC como fotossensibilizadores.	53
Figura 19 – Microscopia confocal da internalização do AM pelas células do biofilme de <i>A. baumannii</i> (ATCC 19606).....	54
Figura 20 – Microscopia confocal da internalização do FTC pelas células do biofilme de <i>A. baumannii</i> (ATCC 19606).....	55
Figura 21 - Análise qualitativa em Microscopia Confocal da viabilidade celular do biofilme de <i>A. baumannii</i> (ATCC 19606) para os grupos controle no escuro .....	56
Figura 22 – Análise qualitativa em microscopia Confocal da viabilidade celular do biofilme de <i>A. baumannii</i> (ATCC 19606) para os <i>grupos</i> experimentais submetidos a irradiação Led.....	57

Figura 23 - Médias e desvio-padrão de UFC/mL obtidos no teste de TFDa com Leds sobre biofilme de <i>A. baumannii</i> cepa ATCC utilizando AM como fotossensibilizador .....	59
Figura 24 - Médias e desvio-padrão de UFC/mL obtidos no teste de TFDa com Leds sobre biofilme de <i>A. baumannii</i> cepa ATCC com diferentes densidades de energia utilizando AM 0,2 mg/mL como fotossensibilizador .....	60
Figura 25 - Médias e desvio-padrão de UFC/mL obtidos no teste de TFDa com Leds sobre biofilme de <i>A. baumannii</i> cepa ATCC, utilizando FTC como fotossensibilizador .....	61
Figura 26 – Curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> para os grupos controle e grupo com lesão de queimadura .....	62
Figura 27 - Curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> com lesão de queimadura infectada por diferentes concentrações de <i>A. baumannii</i> .....	63
Figura 28 – Curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> com lesão de queimadura infectada por <i>A. baumannii</i> submetida à TFDa.....	64
Figura 29 – Pontuação média dos atributos do índice de saúde de larvas de <i>G. mellonella</i> com lesão de queimadura infectada por <i>A. baumannii</i> , submetida à TFDa .....	66

Godoi LMAF. Efeitos do fotoentcine, azul de metileno e farnesol na terapia fotodinâmica antimicrobiana para controle de *Acinetobacter baumannii* [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2021.

## RESUMO

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) tem sido considerada uma alternativa para o tratamento de infecções cutâneas causadas por *Acinetobacter baumannii*. Entretanto, é necessária a busca por fotossensibilizadores ou compostos que potencializem seus efeitos. Os objetivos desse estudo foram testar uma nova Clorina e-6 (Fotoentcine FTC) como fotossensibilizador para TFDa sobre *A. baumannii*, e o Farnesol como potencializador dessa terapia. Além disso, os efeitos do FTC foram comparados ao Azul de Metileno (AM), um fotossensibilizador já aprovado para uso clínico. Para isso, foram empregados os seguintes métodos: 1) Teste de concentração inibitória mínima (CIM) para estabelecer a concentração do Farnesol a ser utilizada no estudo, 2) TFDa em culturas planctônicas com ou sem tratamento prévio com Farnesol, 3) Teste de permeabilidade da membrana celular de *A. baumannii* e análise por microscopia confocal para avaliar a internalização dos fotossensibilizadores, 4) TFDa em biofilmes para determinar a contagem de UFC/mL de *A. baumannii* e a viabilidade celular por fluorescência, 5) Ensaios *in vivo* para avaliar os efeitos da TFDa sobre lesões de queimadura infectadas por *A. baumannii* em *Galleria mellonella*. Como resultados, observou-se no teste de CIM que o Farnesol não teve efeito antimicrobiano sobre *A. baumannii*. A TFDa com AM e FTC reduziu, respectivamente, 4 e 2 log (UFC/mL) de *A. baumannii* em crescimento planctônico. Ambos os fotossensibilizadores foram capazes de penetrar nas células bacterianas, porém o Farnesol não aumentou a permeabilidade celular. A TFDa com AM reduziu 4 log (UFC/mL) de *A. baumannii* em biofilmes, já a TFDa com FTC não apresentou efeito sobre a contagem de UFC/mL. A aplicação da TFDa com FTC não teve efeito sobre as lesões de queimadura em *G. mellonella*, entretanto a TFDa com AM aumentou a sobrevivência das larvas em 35%. Concluiu-se que a TFDa com FTC teve ação antimicrobiana apenas em culturas planctônicas de *A. baumannii* e a ação do Farnesol associada a TFDa foi cepa dependente. Dentro dos parâmetros testados nesse estudo, a atividade antimicrobiana da TFDa com FTC foi inferior ao AM nos ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*. Terapia fotodinâmica. Fotossensibilizadores. Queimaduras.

Godoi LMAF. *Effects of fotoenticine, methylene blue and farnesol on antimicrobial photodynamic therapy for control of Acinetobacter baumannii [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2021.*

## ABSTRACT

*Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has been an alternative for the treatment of skin infections caused by Acinetobacter baumannii. However, it is necessary to search for photosensitizers or compounds that enhance their effects. The objectives of this study were to test a new Chlorine e-6 (Fotoenticine FTC) as a photosensitizer for aPDT on A. baumannii, and Farnesol as an enhancer for this therapy. In addition the effects of FTC were compared to Methylene Blue (MB), a photosensitizer already approved for clinical use. For this, the following methods were used: 1) Minimum inhibitory concentration test (MIC) to establish the concentration of Farnesol to be used in the study, 2) aPDT in planktonic cultures with or without previous treatment with Farnesol, 3) Permeability test of the cell membrane of A. baumannii and analysis by confocal microscopy to assess the internalization of photosensitizers, 4) aPDT in biofilms to determine the CFU/mL count of A. baumannii and cell viability by fluorescence, 5) In vivo assays to evaluate the effects of aPDT on burn injuries infected by A. baumannii in Galleria mellonella. As a result, it was observed in the MIC test that Farnesol had no antimicrobial effect on A. baumannii. aPDT with MB and FTC reduced, respectively, 4 and 2 log (CFU/mL) of A. baumannii in planktonic growth. Both photosensitizers were able to penetrate bacterial cells, however Farnesol did not increase cell permeability. aPDT with MB reduced 4 log (CFU/mL) of A. baumannii in biofilms, whereas aPDT with FTC had no effect on the CFU/mL count. The application of aPDT with FTC had no effect on burn injuries in G. mellonella, however aPDT with MB increased the larvae survival by 35%. It was concluded that aPDT with FTC had antimicrobial action only in planktonic cultures of A. baumannii and the action of Farnesol associated with PDT was a dependent strain. Within the parameters tested in this study, the antimicrobial activity of aPDT with FTC was lower than MB in in vitro and in vivo assays.*

*Keywords: Acinetobacter baumannii. Photodynamic therapy. Photosensitizers. Burns.*

## 1 INTRODUÇÃO

*Acinetobacter baumannii* é um cocobacilo Gram-negativo, imóvel, aeróbio, pertencente à família Moraxellaceae, estando entre os principais patógenos oportunistas associados às infecções nosocomiais (Eze et al., 2018; Moubareck, Halat, 2020; Nasr, 2020). O aumento significativo do número de infecções causadas por *A. baumannii* vêm ocasionando um problema crescente para a comunidade médica, principalmente em Unidades de Terapia Intensiva, onde o tratamento dos pacientes infectados é de difícil controle e resulta em altas taxas de mortalidade (Abdi et al., 2020).

O crescimento de cepas de *A. baumannii* em ambientes hospitalares pode ser atribuído, principalmente, à sua sobrevivência em superfícies abióticas por longos períodos de tempo e à sua alta capacidade em adquirir resistência aos antibióticos (Abdi et al., 2020; Eze et al., 2018; Nasr, 2020). *A. baumannii* também apresenta capacidade de colonizar a pele humana por vários meses (Abdi et al., 2020) e o aparecimento de lesões cutâneas é considerado uma porta de entrada para esse micro-organismo, resultando em infecções locais severas e infecções sistêmicas (Lin et al., 2018). Assim, essa bactéria pode causar uma variedade de infecções, como pneumonia, bacteremia, endocardite, meningite e infecções do trato urinário (Abdi et al., 2020; Wareth et al., 2020).

As infecções de feridas e queimaduras por *A. baumannii* constituem uma grande ameaça à saúde em todo o mundo. O tratamento dessas lesões é extremamente difícil, não apenas pelo desenvolvimento de mecanismos de resistência aos antibióticos, mas também pela formação de biofilmes que tornam *A. baumannii* mais resistente a defesas do hospedeiro e à ação dos agentes antimicrobianos (Pourhajibagher et al., 2016). Lin et al. (2018), em estudo retrospectivo na unidade de tratamento de queimaduras em Taiwan, detectaram *A. baumannii* em 34% dos 222 isolados obtidos das lesões de queimaduras. Esses autores também constataram que, apesar do tratamento com antibiótico, muitos pacientes desenvolveram infecção sistêmica após 10 a 15 dias da infecção cutânea inicial. Em estudo semelhante realizado na Turquia, Atilla et al. (2015) verificaram que *A. baumannii* foi a espécie mais prevalente (33%) nas infecções em queimaduras. Entre esses isolados, 87%

apresentaram perfil de multirresistência aos antibióticos, estando diretamente relacionados com alta taxa de mortalidade.

De fato, muitas das cepas de *A. baumannii* isoladas de infecções nosocomiais demonstram-se resistentes aos antibióticos conhecidos e disponíveis atualmente (Abdi et al., 2020). Yang et al. (2017) identificaram *A. baumannii* em 3,3% dos isolados de úlceras de pele em pacientes hospitalizados no *Daping Hospital* na China, com perfil de resistência para todos os antibióticos testados, incluindo: Amicacina, Imipenem, Piperacilina, Cefepima, Ceftazidima, Levofloxacina, Tobramicina, Aztreonam, Ciprofloxacina, Gentamicina, Ampicilina, Cepazolina, Cefotetana, Ceftriaxona, Furantoina, Sulfamethoxazol, Trimetoprim, Cefuroxima, Meropenem e Ertapenem. Esse alto perfil de resistência está associado com a presença de mecanismos intrínsecos de resistência antimicrobiana nas células de *A. baumannii*, bem como sua grande facilidade em adquirir determinantes genéticos de resistência, como plasmídeos e transposons (Peleg et al., 2008; Mohd Rani et al., 2017). Desse modo, *A. baumannii* está entre as principais bactérias que escapam ao alcance dos antibióticos disponíveis atualmente, denominadas, por Rice (2008), como grupo "ESKAPE" (*Enterococcus faecium* ou *faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.).

Devido ao alto padrão de resistência aos antimicrobianos, o tratamento das infecções por *A. baumannii* em pacientes debilitados tem sido feito com carbapenêmicos (Imipenem e Meropenem), que são antibióticos beta-lactâmicos, de amplo espectro de ação, considerados potentes e utilizados como última opção de tratamento para esses pacientes (Hsu et al., 2017; Papp-Wallace et al., 2011; Mohd Rani et al., 2017). Entretanto, nas últimas décadas, ocorreu um aumento significativo da prevalência de cepas de *A. baumannii* resistentes também aos carbapenêmicos, o que colocou esse micro-organismo na lista de prioridade da Organização Mundial da Saúde em fevereiro de 2017, entre os patógenos que necessitam urgentemente do desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas (Nie et al., 2020; Wareth et al., 2020).

Uma terapia que vem sendo estudada para o tratamento de infecções bacterianas é a terapia fotodinâmica antimicrobiana (do inglês *Antimicrobial Photodynamic Therapy*, aPDT). Essa terapia consiste na administração de um fotossensibilizador atóxico, seguida de irradiação por um feixe de luz visível, com

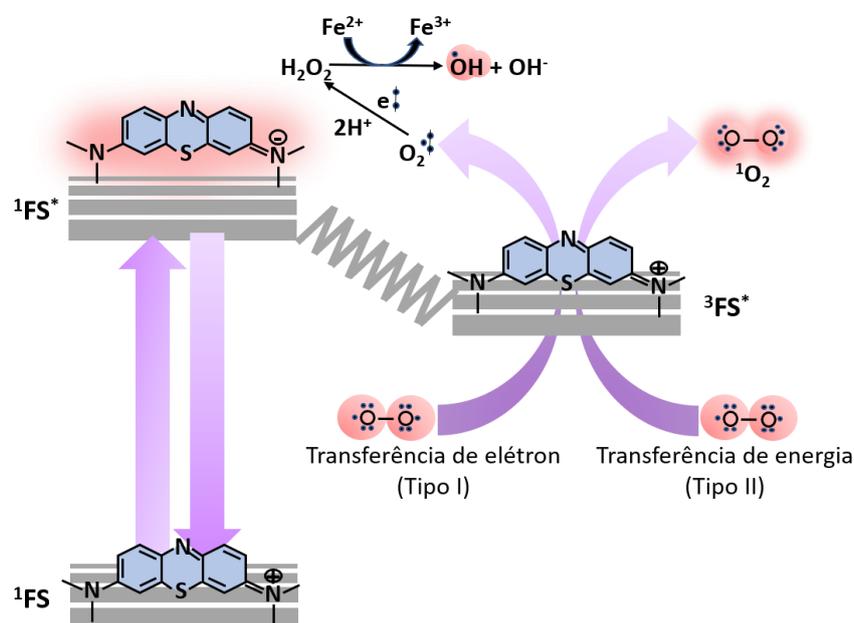
comprimento de onda capaz de ativar o fotossensibilizador, para que possa reagir com o oxigênio, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) (Casas et al., 2011; Dai et al., 2010; Dovigo et al., 2013; François et al., 2013; Gonzales, Maisch 2012; Junqueira et al., 2011; Junqueira et al., 2010; Sahu et al., 2013).

No mecanismo da fotossensibilização (Figura 1), o fotossensibilizador no tecido biológico alvo absorve os fótons de luz e é promovido de um estado singleto fundamental ( $^1\text{FS}$ ) para um estado singleto excitado ( $^1\text{FS}^*$ ). A seguir, ocorre uma reversão de spin do elétron promovido, levando o fotossensibilizador a um estado tripleto fotoativo ( $^3\text{FS}^*$ ). Neste estado, o fotossensibilizador pode reagir com o oxigênio do tecido por dois processos distintos: Reação tipo I, na qual ocorre transferência de elétrons entre o fotossensibilizador e o oxigênio, resultando em espécies citotóxicas, formando o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), que pode formar peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ); e Reação tipo II, na qual há transferência de energia entre fotossensibilizador para o oxigênio, formando o oxigênio singleto. Ambos os produtos dessas reações são EROS, que iniciam o estresse oxidativo e reagem com moléculas biológicas, resultando na morte celular microbiana (Dovigo et al., 2013; St Denis, Hamblin, 2013).

A Terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) possui inúmeras vantagens quando comparada à terapia com antibióticos, como alta especificidade alvo com mínimos efeitos colaterais, ampla janela terapêutica, alcance de resultados imediatos, eliminação de patógenos em biofilmes, ausência de seleção de cepas microbianas resistentes e inibição de fatores de virulência produzidos pelos micro-organismos (Dai et al., 2010; Dovigo et al., 2013; Gonzales, Maisch, 2012).

Em razão do sistema de entrega de luz, a TFDa é uma boa alternativa à áreas do corpo onde a luz pode ser facilmente entregue, como pele e cavidade bucal (Kharkwal et al., 2011). Assim, a TFDa vem sendo estudada de forma promissora para o tratamento de infecções em feridas e queimaduras de pele, nas quais uma simples aplicação tópica do fotossensibilizador na área infectada é seguida por irradiação de luz num comprimento de onda capaz de penetrar nos tecidos (Dai et al., 2009; St. Denis et al., 2011; Kharkwal et al., 2011).

Figura 1 - Diagrama de Jablonski modificado



Fonte: St Denis e Hamblin, 2013.

Dai et al. (2009) avaliaram os efeitos da TFDa, utilizando como fotossensibilizador um conjugado de porfirina catiônica (PEI-ce6), sobre lesões de queimaduras em camundongos infectados por *A. baumannii*. Para a infecção, foi construída uma cepa bioluminescente de *A. baumannii* obtida a partir de isolado clínico multirresistente. Os resultados alcançados pela TFDa foram avaliados pela análise de bioluminescência, contagem de células viáveis (UFC/mL) e análise microscópica dos tecidos dos animais. Após 5 dias da infecção com 4 aplicações de TFDa, a luminescência bacteriana do grupo não tratado foi 2 log maior do que o grupo tratado, indicando que a TFDa levou a uma redução bacteriana significativa. Esses dados também foram confirmados pelo número de células de *A. baumannii* recuperados dos tecidos ( $10^{10}$  UFC/mL para o grupo não tratado e  $10^8$  UFC/mL para o grupo tratado). Da mesma forma, uma menor quantidade de bactérias no grupo tratado foi detectada nos cortes histológicos. Os autores concluíram que embora a TFDa não tenha levado a uma eliminação total da infecção, essa terapia pode ser efetiva como tratamento coadjuvante nas infecções localizadas causadas por *A. baumannii*.

Utilizando a mesma cepa bioluminescente de *A. baumannii* do estudo de Dai

et al. (2009), Ragàs et al. (2010) investigaram os efeitos de 4 fotossensibilizadores fenotiazínicos (azul de toluidina, azul de metileno, cloreto de azul de 1,9-dimetilmetileno e o novo azul de metileno N) na TFDa sobre culturas planctônicas. Todos os fotossensibilizadores apresentaram atividade antimicrobiana sobre *A. baumannii*, mas o novo azul de metileno N alcançou reduções de UFC/mL de aproximadamente 6 log, enquanto os demais fotossensibilizadores levaram a reduções microbianas apenas de 2 a 3 log. Desse modo, os autores selecionaram o novo azul de metileno N para a aplicação da TFDa *in vivo*, no qual foram encontradas reduções de 2,3 log de *A. baumannii* em lesões de queimaduras induzidas em camundongos.

Yuan et al. (2017) analisaram a eficácia antimicrobiana de um novo conjugado de porfirina catiônica, com quatro grupos de lisinas (4I), sobre dois isolados clínicos de *A. baumannii*, sendo um sensível e outro multirresistente. Ambos os isolados apresentaram sensibilidade à TFDa em culturas planctônicas, mas apenas o isolado multirresistente foi testado *in vivo*. A aplicação da TFDa em feridas cutâneas em camundongos resultou em redução de 2,89 log de UFC/mL após 24 h do tratamento e acelerou o processo de cicatrização durante 10 dias de observação.

Com o objetivo de investigar a sensibilidade de diferentes cepas clínicas de *A. baumannii* à TFDa, em trabalho anterior (Mello et al., 2019), nosso grupo de pesquisa analisou a ação da TFDa sobre culturas planctônicas de *A. baumannii* comparando isolados sensíveis e resistentes aos antibióticos com relação à sensibilidade à TFDa. Foram usados 21 isolados de *A. baumannii* de pacientes hospitalizados, sendo 18 cepas resistentes e 3 sensíveis aos antibióticos carbapenêmicos. A aplicação da TFDa mediada pelo azul de metileno teve ação antibacteriana para todos os isolados testados, com redução microbiana de 63-88% de UFC/mL nos isolados sensíveis e 26-97% nos isolados resistentes aos antibióticos. Esses dados sugerem que a TFDa apresenta grande potencial para ser usada em ambientes hospitalares no controle das infecções por *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos.

Diante dos resultados desses estudos, pode-se observar que embora a TFDa tenha levado a uma redução significativa de *A. baumannii* em culturas planctônicas e infecções experimentais, até o momento a TFDa não conseguiu a eliminação total desse micro-organismo. Sabe-se que os resultados da TFDa dependem da natureza

das células, mas também das condições de irradiação e propriedades do fotossensibilizador (Kou et al., 2017). Entre as propriedades ideais de um fotossensibilizador estão: baixa toxicidade no escuro, alto rendimento quântico de EROS, capacidade de absorção em comprimento de onda onde ocorre boa penetração da luz no tecido, fotossensibilidade de curta duração, simplicidade na formulação, farmacocinética favorável, facilidade de manuseio, possibilidade de obtenção em escala industrial a custo reduzido, facilidade de análise total dos componentes da fórmula, alta afinidade e ação seletiva nas células microbianas (Hamblin, 2016; Simplicio et al., 2002).

Na busca por tais características ideais, vários fotossensibilizadores têm sido investigados e desenvolvidos, como os fenotiazínicos, derivados da hematoporfirina, clorinas, xantenos, fitalocianinas e derivados de produtos naturais (Bayona et al., 2017; Junqueira et al., 2011). Certamente, fenotiazínicos azul de metileno e azul de toluidina são os fotossensibilizadores mais usados até hoje. Ambos compostos receberam aprovação regulamentar em vários países do mundo para uso em TFDa. Entretanto, os fenotiazínicos não são altamente ativos e muitos laboratórios tem tentado introduzir compostos com maior atividade, ou alternativamente, corantes derivados de produtos naturais que possuem facilidade para conseguir aprovação das agências regulatórias, como a curcumina (Hamblin, 2016).

Entre os compostos com maior atividade para serem usados na TFDa, a Clorina vem se mostrando um ótimo fotossensibilizador em diversos tratamentos, como no caso das leucoplasias (Pietruska et al., 2014). A Clorina é um fotossensibilizador de segunda geração que pertence à classe de substâncias tetrapirrólicas, podendo ser ativada pela luz na faixa de 650-800nm, região mais favorável por apresentar maior penetração da luz ao tecido, por isso é mais estável, possibilitando o tratamento de lesões mais profundas (Silva, 2007). Entretanto, na literatura poucos trabalhos investigaram o efeito da Clorina na TFDa antimicrobiana. Schastak et al. (2008) encontraram uma ação efetiva da Clorina e-6 (Photolon TM, BLC1013) na TFDa contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Khademi et al. (2014) verificaram que a TFDa mediada por poli-L-lisina-Clorina conjugada (pL-ce6) foi eficaz na redução de *Candida albicans*. Embora a Clorina seja bastante promissora, não existem trabalhos que testaram seus efeitos como fotossensibilizador no controle de *A. baumannii*, o que torna interessante

conhecer sua atividade sobre esse micro-organismo, tanto em culturas planctônicas e biofilmes, como em modelos *in vivo* de infecção induzida por queimadura.

Além da busca por novos fotossensibilizadores, torna-se interessante também investigar compostos que possam potencializar a ação da TFDa. Assim, esse projeto de pesquisa tem como proposta inovadora associar o Farnesol à TFDa. O Farnesol (sesquiterpeno de 12 Carbonos) é uma molécula natural de *quorum sensing* secretada por *Candida albicans*, que tem sido bastante estudada para inibição do crescimento de bactérias patogênicas (Bandara et al., 2016; Kostoulis et al., 2015; Polke, Jacobsen, 2017).

A hipótese de que o Farnesol possa potencializar a TFDa está baseada em estudos prévios que mostram que o Farnesol interfere com a integridade da membrana de *A. baumannii* (Kostoulis et al., 2015), induz o acúmulo de EROS intracelular em *Staphylococcus aureus* (Kong et al., 2017) e aumenta a sensibilidade dos biofilmes de *Streptococcus mutans* às EROS (Cao et al., 2017). Kostoulis et al. (2015) estudaram os efeitos do Farnesol sobre *A. baumannii*, verificando que o Farnesol levou a uma desregulação de muitos genes envolvidos na biogênese da membrana celular, na bomba de efluxo (AcrAB-like e AdelJK-like) e na formação de biofilme (*csuA*, *csuB* e *ompA*). Esses dados transcricionais foram suportados por ensaios experimentais que mostraram que o Farnesol foi capaz de romper a integridade da membrana celular, alterar a morfologia da célula e inibir a formação de biofilmes. O Farnesol também potencializou a atividade do antibiótico colistina, que tem ação sobre a membrana celular bacteriana.

Desse modo, o objetivo desse trabalho foi buscar alternativas para aumentar a eficácia da TFDa sobre *A. baumannii*, que possam ser usadas futuramente para tratar infecções cutâneas localizadas, principalmente em pacientes hospitalizados. Para tanto, usando modelos de estudo *in vitro* e *in vivo*, foram investigados os efeitos de uma nova Clorina e-6, o Fotoenticine, como fotossensibilizador para TFDa. Além disso, foi testada a ação do Farnesol como possível agente potencializador dessa terapia.

## 2 PROPOSIÇÃO

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo desse estudo foi testar o Fotoenticine, como fotossensibilizador, e o Farnesol, como potencializador, da TFDa sobre *A. baumannii* por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*. Além disso, os efeitos do Fotoenticine foram comparados ao Azul de metileno, um fotossensibilizador tradicional aprovado para uso clínico.

### 2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- a) Verificar ação antimicrobiana do Farnesol por meio da Concentração Inibitória Mínima;
- b) Avaliar a influência do Farnesol na permeabilidade celular e absorção dos fotossensibilizadores Fotoenticine e Azul de metileno pelas células de *A. baumannii*;
- c) Estudar a ação da TFDa em culturas planctônicas de *A. baumannii*, testando diferentes condições experimentais: Fotoenticine, Azul de Metileno, Farnesol, Laser e Led;
- d) Investigar a ação da TFDa com Fotoenticine e Azul de Metileno nos biofilmes de *A. baumannii*;
- e) Testar os efeitos *in vivo* da TFDa com Fotoenticine e Azul de Metileno sobre lesões de queimadura infectadas por *A. baumannii* em modelo de *Galleria mellonella*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Cepas de *A. baumannii*

Foram utilizadas 3 cepas clínicas de *A. baumannii* H718 (A1), H557 (A2) e HC656 (A4) obtidas do Laboratório Bioclin de São José dos Campos - SP. A identificação e o antibiograma das cepas foram determinados pelo sistema semi-automatizado MicroSCAN 4 (Beckman coulter, Indianápolis, Estados Unidos), que utiliza microdiluição em caldo, reações bioquímicas e leitura óptica das placas. O perfil de resistência das cepas utilizadas está descrito no Quadro 1. Como referência, foi usada uma cepa padrão de *A. baumannii* (ATCC 19606) cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

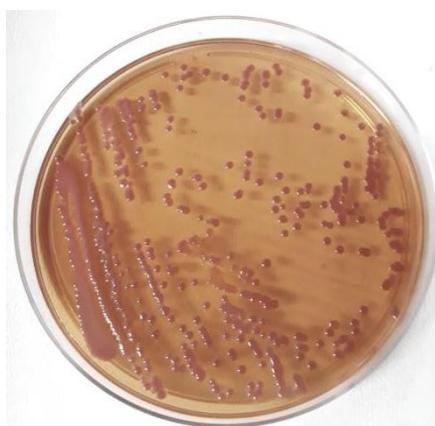
Todas as cepas estão armazenadas em estoques congelados em Caldo Infuso Cérebro Coração (BHI, Himedia®, Mumbai, Índia), contendo 20% de Glicerina (Didatica, São Paulo, Brasil) a -80°C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos da Universidade Estadual Paulista (Unesp). Para ativação dos micro-organismos, as cepas de *A. baumannii* foram cultivadas em meio de cultura ágar MacConkey (Himedia®, Mumbai, Índia) e incubadas por 24 h a 37°C em estufa bacteriológica. A seguir, colônias características de *A. baumannii* (Figura 2) foram transferidas para o meio de semeadura caldo BHI e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h.

Quadro 1 – Perfil de resistência das 3 cepas clínicas de *A. baumannii* perante antimicrobianos convencionais

<b>Antimicrobianos convencionais</b>	<b>Cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> H718 (A1), H557 (A2) e HC656 (A4)</b>
Amicacina	Resistente
Cefepime	Resistente
Cefoxitina	Resistente
Ceftazidima	Resistente
Ciprofloxacina	Resistente
Cloranfenicol	Resistente
Gentamicina	Resistente
Meropenem	Resistente
Imipenem	Resistente
Ertapenem	Resistente
Sulfazotrim	Resistente
Tetraciclina	Resistente

Legenda: Dados obtidos pelo sistema MicroSCAN 4, Laboratório Bioclin, São José dos Campos – SP.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 2 - Placa de ágar MacConkey contendo crescimento de *A. baumannii*, caracterizado pela presença de colônias rosadas com aspecto cremoso



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.2 Preparo das suspensões padronizadas de *A. baumannii*

Para realização de cada teste experimental, foi preparada uma suspensão padronizada de *A. baumannii*. Para tanto, a cepa foi cultivada em caldo BHI a 37°C por 24 h, a cultura então foi centrifugada a 5000 rpm durante 10 min (MPW 350, Med. Instruments, Varsóvia, Polônia) e o sobrenadante desprezado. A seguir, o sedimento foi suspenso em 5 mL de solução salina tampão fosfato (NaCl 0,9%) esterilizada (PBS). Esse procedimento foi repetido mais uma vez. A leitura do número de células da suspensão foi realizada por meio de espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 600 nm, a fim de obter densidade óptica igual a 0,15. Com o propósito de confirmar o número de células bacterianas no inóculo utilizado, alíquotas de diluições seriadas do inóculo foram semeadas em placas contendo ágar BHI por 24 h a 37°C para contagem de UFC/mL.

### 3.3 Fotossensibilizadores, fonte de luz e Farnesol

Como fotossensibilizadores foram utilizados o Azul de Metileno (AM) e o Fotoenticine (FTC). O AM (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foi preparado pela dissolução do pó em água destilada na concentração de 0,1 mg/mL (300  $\mu$ M), já estabelecida em estudo anterior (Mello et al., 2019) para culturas planctônicas. O FTC (Fotoenticine®, Nuevas Tecnologías Científicas, Llanera, Espanha) foi doado pela Empresa Nuevas Tecnologías Científicas, na concentração de 6,8 mg/mL. Para o trabalho, o FTC foi testado em concentrações de 0,4, 0,6, 0,8 e 1 mg/mL, diluídas em PBS. Ambos os fotossensibilizadores foram esterilizados por filtração em membranas com poros de 0,22  $\mu$ m de diâmetro (MFS, Dublin, EUA) e armazenados no escuro.

Duas fontes de luz foram utilizadas, ambas com comprimento de onda de 660 nm (vermelho visível): um Laser de baixa intensidade de Arseneto de Gálio Alumínio (Photon Lase III, DMC, São Carlos, SP, Brasil), na potência de 50 mW, densidade de potência de 50 mW/cm<sup>2</sup>, densidade de energia de 15 J/cm<sup>2</sup> e tempo de exposição de 300 s; e um dispositivo composto por 48 Leds, dispostos em uma matriz (IrradLed 48,

Biopdi, São Carlos, SP, Brasil) densidade de potência de 42,8 mW/cm<sup>2</sup>, densidade de energia de 30 J/cm<sup>2</sup> e tempo de exposição de 700 s.

O Farnesol (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) foi preparado como solução estoque na concentração de 50 mM em metanol. Para cada experimento, a partir da solução estoque foram preparadas concentrações de 0,25 a 4 mM. Para os grupos controles, foi utilizada uma concentração equimolar de metanol (Kostoulias et al., 2015).

### 3.4 Distribuição dos grupos de estudo e delineamento experimental

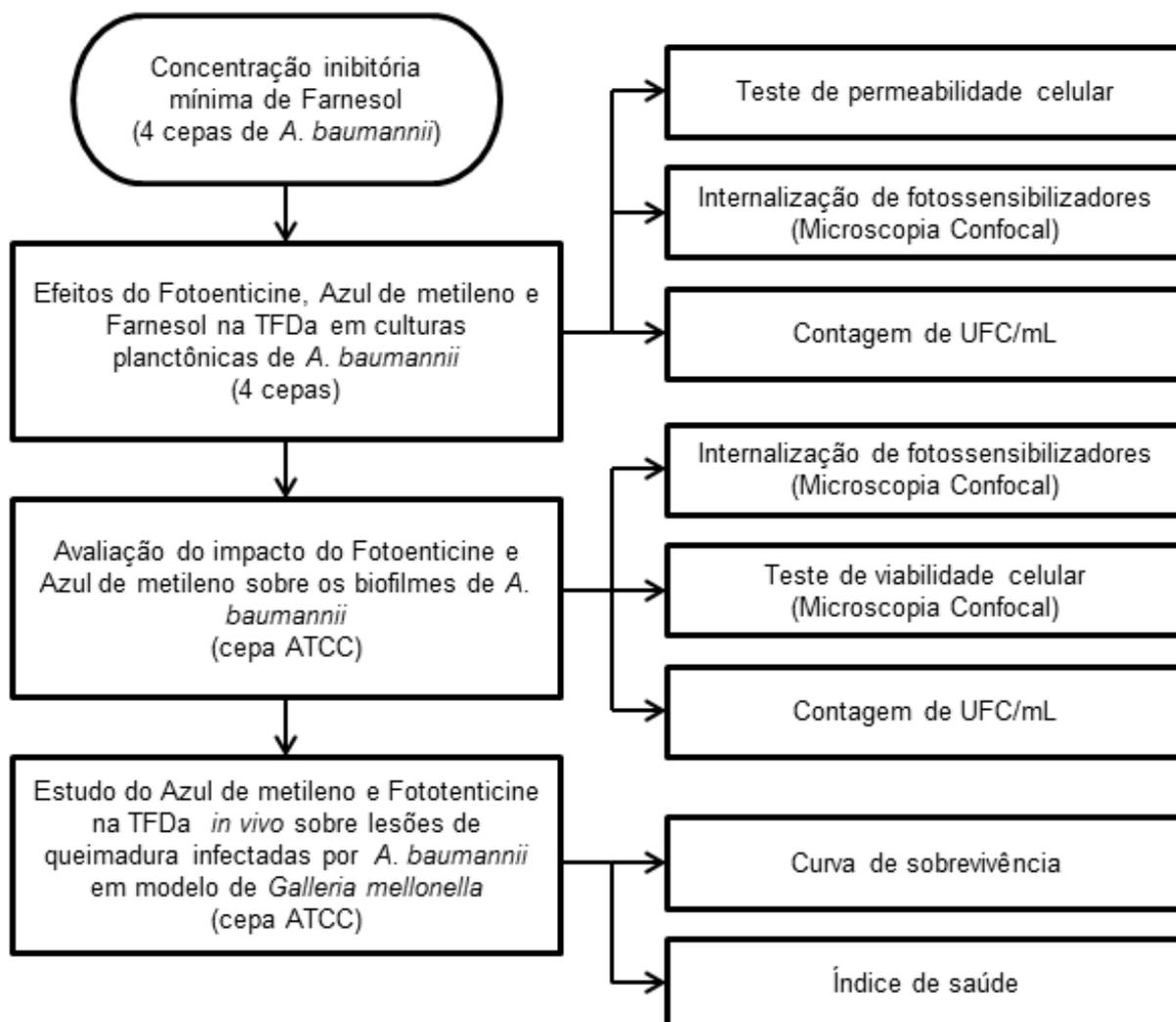
Os grupos experimentais foram divididos de acordo com o Quadro 2 e o projeto de pesquisa foi realizado conforme apresentado na Figura 3.

Quadro 2 - Divisão dos grupos experimentais

<b><i>A. baumannii</i> não tratado com Farnesol</b>	<b><i>A. baumannii</i> previamente tratado com Farnesol</b>
Fotoenticine e luz (FTC+L+)	Fotoenticine e luz (Fa+FTC+L+)
Azul de Metileno e luz (AM+L+)	Azul de Metileno e luz (Fa+AM+L+)
Fotoenticine sem irradiação (FTC+L-)	Fotoenticine sem irradiação (Fa+FTC+L-)
Azul de Metileno sem irradiação (AM+ L-)	Azul de Metileno sem irradiação (Fa+AM+L-)
Luz na ausência do fotossensibilizador (F-L+)	Luz na ausência do fotossensibilizador (Fa+F-L+)
Ausência do fotossensibilizador e luz (F-L-)	Ausência do fotossensibilizador e luz (Fa+F-L-)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 3 - Fluxograma com as etapas do projeto de pesquisa



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Farnesol

Inicialmente, foi determinada a CIM do Farnesol pelo teste de microdiluição em caldo de acordo com as normas estabelecidas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), M07-A9, que descreve testes em bactérias aeróbias. O objetivo de realizar o teste de CIM para o Farnesol foi verificar se esse composto tem atividade antimicrobiana sobre *A. baumannii*, e nesse caso determinar a concentração

subinibitória para que seu possível efeito sinérgico com a TFDa pudesse ser investigado nos testes seguintes.

As cepas padrão e clínicas de *A. baumannii* foram semeadas em ágar MacConkey e incubadas a 37°C por 24 h. A partir do crescimento, colônias foram suspensas em 5 mL de PBS e agitadas em vortex durante 15 s. A seguir, a densidade celular foi ajustada em espectrofotômetro, acrescentando-se PBS suficiente para se obter uma concentração equivalente a  $10^8$  células/mL. Essa concentração foi posteriormente diluída em  $10^6$  células/mL, segundo as recomendações (CLSI).

Para determinação da CIM do Farnesol foram analisadas concentrações entre 0,25 a 4 mM. As diluições do Farnesol foram realizadas em meio Mueller-Hinton (Difco, Mumbai, Índia), distribuído no volume de 100 µL em cada poço da microplaca (Costar Corning, Nova York, EUA). A seguir, 200 µL de Farnesol, na concentração de 4 mM, foram adicionados no primeiro poço de cada cepa, de onde partiram 5 diluições seriadas. Depois de realizada a diluição do Farnesol, 100 µL das suspensões de *A. baumannii* padronizadas, cepa padrão e clínicas, foram adicionados em cada poço correspondente.

Foram realizados também grupos controle: negativo, com 100 µL da suspensão padronizada + 100 µL de caldo Mueller-Hinton; de esterilidade do veículo, com 100 µL do veículo usado no preparo do Farnesol + 100 µL de caldo Mueller-Hinton; de esterilidade do meio, com 200 µL de caldo Mueller-Hinton e um controle de turbidez do Farnesol, com 100 µL de Farnesol nas diferentes diluições + 100 µL de caldo Mueller-Hinton.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Após incubação por 24 h a 37°C, foi realizada a leitura por meio da observação visual da turvação do meio. Nesse método, a CIM é considerada como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento microbiano em caldo.

### **3.6 Estudo da TFDa sobre culturas planctônicas de *A. baumannii***

### **3.6.1 Análise da absorção dos fotossensibilizadores pelas células de *A. baumannii* (ATCC 19606)**

Esse teste foi realizado de acordo com a metodologia de George e Kishen (2007) com algumas modificações. As cepas de *A. baumannii* foram cultivadas em estufa bacteriológica a 37°C em caldo BHI. As células foram recolhidas por centrifugação de 5000 rpm durante 10 min e foram lavadas com água destilada. A densidade óptica das culturas foi ajustada para  $10^8$  células/ mL. As células foram colhidas a partir de 200 µL de cada suspensão e foram colocadas em microtubos com 200 µL de fotossensibilizador (FTC ou AM) ou água destilada, na proporção 1:1, de acordo com o grupo experimental das suspensões, e foram incubadas a 37°C durante 15 min em uma incubadora orbital a 120 rpm. Após esse período, as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com água destilada e lisadas por tratamento com 200 µL de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) a 2%, permanecendo em contato durante 16 h. A intensidade de absorbância da solução do sobrenadante após a centrifugação 5000 rpm durante 10 min foi registrada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 600 nm. O fotossensibilizador absorvido pelas células bacterianas, a partir da solução original, foi calculado e representado graficamente.

Além de determinar a capacidade das células de *A. baumannii* em absorver os fotossensibilizadores, também foi realizado um teste para verificar se o pré-tratamento com uma dose subinibitória do Farnesol seria capaz de aumentar a absorção dos fotossensibilizadores pelas células microbianas. Nesse caso, antes da adição dos fotossensibilizadores, a suspensão de *A. baumannii* permaneceu em contato com o Farnesol, na concentração subinibitória, por 2 h.

### 3.6.2 Análise por Microscopia Confocal da internalização dos fotossensibilizadores pelas células de *A. baumannii* (ATCC 19606)

Para verificar a internalização dos fotossensibilizadores, foi preparada uma suspensão padronizada de *A. baumannii* e distribuída em tubos de 15 mL, de acordo com os grupos experimentais, esses tubos foram centrifugados (5000 rpm por 10 min) e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de fotossensibilizador, FTC (0,4 mg/mL) ou AM (0,1 mg/mL), conforme o grupo, e os tubos permaneceram por 15 minutos em temperatura ambiente no escuro. Em seguida foi realizada uma lavagem com PBS e a amostra foi novamente ressuspensa em 200 µL de Formaldeído (Ecibra, São Paulo, SP, Brasil) a 4% para sua fixação. Seguida a fixação, 100 µL da solução foram depositados por poço em placas de 24 poços (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) contendo lamínulas circulares (Knittel Glass, Alemanha) previamente tratadas com Poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil), e mantidos em geladeira a 4°C durante o período mínimo de 18 h.

Após esse período, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro. Foram adicionados 15 µL de *Prolong™ Diamond Antifade Mountand with DAPI* (Invitrogen™, São Paulo, SP, Brasil) e as lâminas mantidas no escuro por no mínimo 18 h para secagem e leitura. A análise foi realizada utilizando microscópio Confocal LSM 700 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com excitação no comprimento de 405 nm para DAPI, 555 nm para AM e 488 nm para FTC.

### 3.6.3 Aplicação da TFDa sobre *A. baumannii* em culturas planctônicas

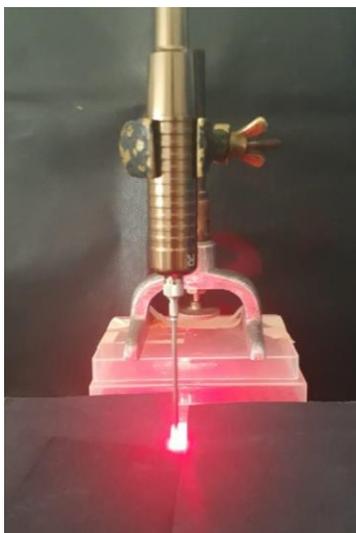
Para realização da TFDa em culturas planctônicas de *A. baumannii*, primeiramente foi padronizada a concentração de FTC a ser utilizada no estudo. Para isso foram testadas diferentes concentrações de FTC 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg/mL sobre as culturas planctônicas sem irradiação, a fim de verificar a toxicidade do FTC no escuro.

Após a verificação da toxicidade de FTC sobre as culturas plantônicas de *A. baumannii*, foi realizado o teste para obtenção da concentração de FTC que seria mais efetiva na aplicação da TFDa. Com a concentração mais efetiva selecionada foram seguidos os demais testes em culturas planctônicas.

Para realização da fotossensibilização em culturas planctônicas foi seguida a metodologia previamente descrita por Costa et al. (2010). Foram usadas placas de 96 poços, nas quais foram adicionados 50 µL da suspensão bacteriana, previamente padronizada, em cada poço da placa. A seguir foram acrescentados 50 µL do Farnesol em concentração subinibitória. As placas foram incubadas a 37°C por 2 h, e foi adicionado aos poços 100 µL do fotossensibilizador (FTC ou AM), então as placas foram envolvidas com papel alumínio para evitar a exposição à luz do ambiente respeitando-se o tempo de pré-irradiação de 15 min em agitação orbital (Solab, Piracicaba, Brasil). Posteriormente, foi realizada a irradiação com Laser ou Led nos parâmetros já determinados. Os demais grupos foram realizados de acordo com as condições experimentais descritas acima. Todo experimento foi realizado no escuro.

No caso do Laser, a fibra óptica com diâmetro de 0,02 cm<sup>2</sup> foi posicionada na parte superior da placa em contato com a tampa, utilizando-se um anteparo negro fosco para evitar espalhamento da luz (Figura 4). Já com o dispositivo de Leds, a placa foi acondicionada na posição 1 do suporte acrílico, fazendo com que a irradiação fosse realizada na porção inferior da placa (Figura 5).

Figura 4 - Laser aplicado sobre a placa de 96 poços com anteparo escuro



Fonte: Elaborada pelo autor.

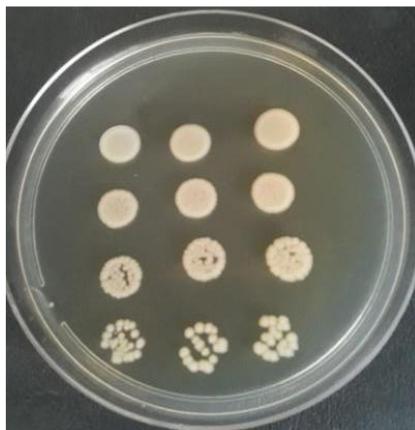
Figura 5 – Leds para aplicação na porção inferior da placa de 96 poços



Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a irradiação, foram preparadas diluições seriadas ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ), e alíquotas de 10  $\mu$ L de cada diluição e do puro foram semeadas em gotas únicas, em placas de ágar BHI (Figura 6), em triplicata, e incubadas durante 24 h a 37°C. Depois da incubação, foi determinado o número de UFC/mL.

Figura 6 - Crescimento de colônias de *A. baumannii* em meio de cultura ágar BHI, semeadas pela técnica da gota



Fonte: Elaborada pelo autor.

### **3.7 Estudo da TFDa sobre biofilmes de *A. baumannii***

#### **3.7.1 Formação de biofilme de *A. baumannii***

Para a formação de biofilme foi utilizada a metodologia descrita por Thein et al. (2006) com modificações. Biofilmes monotípicos foram formados em fundo de placa de microtitulação de 96 poços. Inicialmente, em cada poço foram adicionados 100  $\mu$ L da suspensão padronizada de *A. baumannii* ( $10^8$  células/mL) e 100  $\mu$ L de caldo BHI, a placa foi incubada a 37°C por 90 minutos para promover a adesão inicial dos micro-organismos.

Após a fase de adesão inicial, a suspensão de células foi aspirada, para remover as células não aderidas, os poços foram lavados duas vezes com 200  $\mu$ L de PBS. Após a lavagem, 200  $\mu$ L de caldo BHI foram adicionados em cada poço, então as placas foram incubadas a 37°C por 48 h, e o caldo foi trocado em 24 h.

### 3.7.2 Aplicação da TFDa sobre biofilme de *A. baumannii*

Para a realização dos ensaios de TFDa em biofilmes, foram estudados apenas os grupos experimentais não tratados com Farnesol, conforme descritos no Quadro 2. Após a formação do biofilme, o sobrenadante foi aspirado e os poços foram lavados por 2 vezes com PBS, de acordo com o grupo a ser realizado, foi adicionado quando necessário 200  $\mu$ L do fotossensibilizador (FTC ou AM). Nos grupos em que não foi utilizado o fotossensibilizador, foi acrescido o mesmo volume em PBS. Após tempo de pré-irradiação de 30 min, em agitador orbital, os biofilmes dos grupos com presença de luz, foram submetidos à irradiação com o dispositivo de Leds.

Todo experimento foi realizado no escuro em câmara de fluxo laminar.

### 3.7.3 Análise por Microscopia Confocal da internalização dos fotossensibilizadores em células de *A. baumannii* (ATCC 19606) em biofilme

Para realização desta análise, os biofilmes foram formados, conforme descrito no item 3.7.1, em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares previamente tratadas com Poli-L-lisina. De acordo com o grupo a ser realizado, foi adicionado 200  $\mu$ L do fotossensibilizador, FTC (1,2 mg/mL) ou AM (0,2 mg/mL). Para verificar a internalização dos fotossensibilizadores nas células organizadas em biofilme, após contato por 30 min com o fotossensibilizador esse foi aspirado, em seguida foi feita uma lavagem com 100  $\mu$ L de PBS pela parede de cada poço cuidadosamente e a fixação com 200  $\mu$ L Formaldeído a 4%. Após a fixação, o conjunto foi mantido em geladeira à 4°C por no mínimo 18 h. Posteriormente, foi feita a montagem das lamínulas em lâminas de vidro, foi adicionado 15  $\mu$ L de *Prolong<sup>TM</sup> Diamond Antifade Mountand with DAPI* e as lâminas foram mantidas no escuro por no mínimo 18 h para secagem e leitura. A análise foi realizada utilizando microscópio Confocal LSM 700 com excitação no comprimento de 405 nm para DAPI, 555 nm para AM e 488 nm para FTC.

### **3.7.4 Teste de viabilidade celular por fluorescência em células da cepa ATCC de *A. baumannii* em biofilme**

Baseado no estudo de Li et al. (2020), para análise da viabilidade do biofilme bacteriano por fluorescência, foi utilizando kit Live/Dead® BacLight™ (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). O kit de viabilidade é composto por dois marcadores fluorescentes: Syto-9 e Iodeto de propídeo (PI). As células que apresentam dano na membrana fluorescem em vermelho (PI), enquanto as vivas fluorescem em verde (Syto-9).

Após a formação do biofilme, conforme descrito no item 3.7.1, em placas de 24 poços contendo as lamínulas previamente tratadas com Poli-L-lisina, foi feito o tratamento com a TFDa, conforme o item 3.7.2, de acordo com o grupo. Em seguida foi retirado o sobrenadante e acrescentado 200 µL de PBS aos poços. Passado o período de 4 h de intervalo, o sobrenadante foi retirado dos poços e acrescentado 100 µL do kit para a interação durante 15 min no escuro, conforme informações do fabricante. Seguida a interação, foi retirado o sobrenadante, adicionado 200 µL Formaldeído a 4% e mantido em geladeira à 4°C por no mínimo 18 h. Posteriormente, foi feita a montagem das lamínulas em lâminas de vidro e a análise foi realizada utilizando microscópio Confocal Zeiss LSM 700 com excitação no comprimento de 466 nm para o SYTO 9, 555 nm para Iodeto de propídeo.

### **3.7.5 Análise dos efeitos da TFDa sobre os biofilmes de *A. baumannii* por meio da determinação do número de UFC/mL**

Após a irradiação, o biofilme aderido ao fundo de placa foi removido utilizando homogeneizador ultra-sônico (Sonopuls HD 2200, Bandelin Eletronic, Berlim, Alemanha) com potência de 7 W por 30 s para desagregar o biofilme.

A partir da solução obtida, foram realizadas diluições seriadas ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ) da suspensão do biofilme, das quais alíquotas de 10 µL de cada diluição foram semeadas em gotas únicas, em placas de ágar BHI, em triplicata, e incubadas durante 24 h a 37°C. Depois da incubação, foi determinado o número de UFC/mL.

### **3.8 Análise dos efeitos *in vivo* da TFDa em modelo de queimadura de *G. mellonella* infectadas com *A. baumannii* (ATCC 19606)**

#### **3.8.1 Larvas de *G. mellonella***

Larvas de *G. mellonella* em seu estágio final da fase larval foram utilizadas como modelo hospedeiro. As larvas foram provenientes do Laboratório de Invertebrados do Instituto de Ciência e Tecnologia – ICT, Unesp de São José dos Campos. Na criação de *G. mellonella*, é realizada limpeza e a alimentação das larvas três vezes por semana. A alimentação é baseada em cera, e ração composta de 25% de fubá, 15% de levedura de cerveja, 10% de farinha de soja, 10% de leite desnatado, 20% de mel e 20% de glicerol, preparada na própria Instituição.

Cada grupo experimental foi composto por 10 larvas escolhidas aleatoriamente e com peso corporal entre 250 e 300 mg. Todas as larvas selecionadas apresentavam cor clara e estavam livres de manchas e/ou pigmentos escuros em sua cutícula, que podem indicar o comprometimento do animal por algum processo infeccioso, influenciando assim no resultado do experimento. Todas as análises foram realizadas em duplicata e durante o experimento as larvas não receberam alimentação.

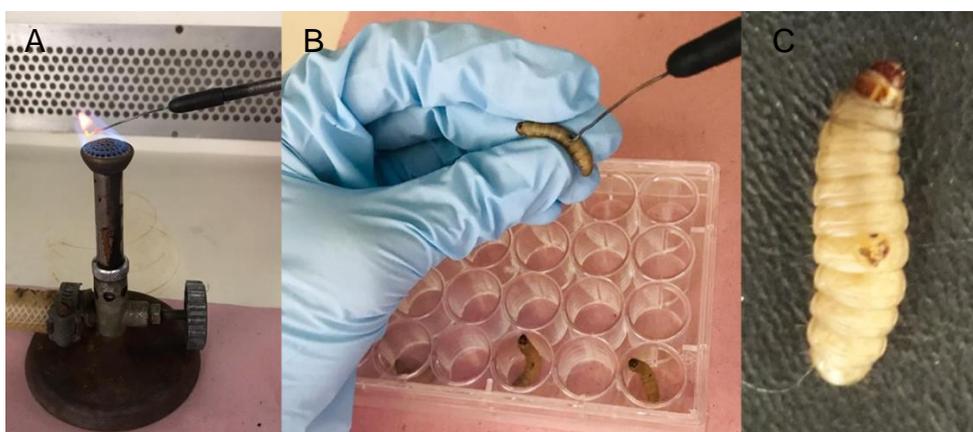
Para cada ensaio, sempre foi incluído um grupo controle composto por larvas que não receberam intervenção alguma, a fim de controlar a qualidade da criação de larvas. Em casos em que no grupo controle houve duas larvas mortas, o ensaio foi desconsiderado e um novo refeito.

#### **3.8.2 Indução da queimadura e infecção em *G. mellonella***

O modelo de queimadura realizado seguiu a metodologia de Maslova et al. (2020) com algumas modificações. As larvas foram acondicionadas em placas de 24 poços estéreis (10 larvas por placa) e mantidas em geladeira a 4°C até o uso. Foi realizada a antissepsia da cutícula das larvas com etanol 70%. Posteriormente, a lesão de queimadura foi induzida com um instrumento de aço aquecido para atingir

uma área de aproximadamente 2 mm<sup>2</sup>. O instrumento de metal usado foi de baixa condutividade térmica, selecionado para gerar queimaduras reproduzíveis. O instrumento foi aquecido até ao rubro e após 4 s foi aplicado na porção dorsal das larvas por um período fixo de 4 s (Figura 7).

Figura 7 – Metodologia de queimadura realizada no modelo experimental de *G. mellonella*

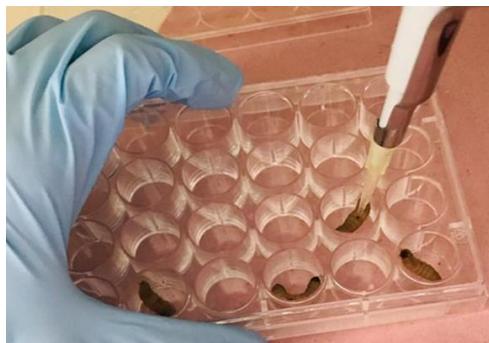


Legenda: a) Aquecimento do instrumento de metal usado para a queimadura até ao rubro; b) Aplicação do instrumento de metal aquecido na região dorsal da larva; c) Lesão de queimadura em larva de *G. mellonella*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para infecção, imediatamente após a queimadura, a larva foi acondicionada no poço da placa de 24 poços e a ferida recebeu 10 µL de suspensão bacteriana padronizada em 10<sup>8</sup> células/mL de *A. baumannii* (ATCC 19606) (Figura 8). Larvas que apresentaram vazamento de hemolinfa após o processo de queimadura foram imediatamente removidas do grupo e sacrificadas por incubação a -20°C por no mínimo 20 min.

Figura 8 – Metodologia de infecção em lesão de queimadura no modelo de *G. mellonella*



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.8.3 Realização da TFDa em *G. mellonella* infectadas por *A. baumannii*

Para realização da TFDa em *G. mellonella* foi seguida a metodologia de Chibebe Jr et al. (2013) com algumas modificações. A fotossensibilização bem como a fonte de luz e seus parâmetros utilizados foram descritos anteriormente.

As larvas submetidas à lesão de queimadura e infectadas com *A. baumannii*, após 30 min da infecção foram submetidas à TFDa. Para isso, as larvas receberam 10 µL de fotossensibilizador na ferida de queimadura, a seguir, permaneceram 30 min no escuro para proporcionar uma boa dispersão do fotossensibilizador no local. Então, a irradiação Led foi aplicada de acordo com os parâmetros previamente definidos. Cada grupo de larvas foi distribuído em uma placa de 24 poços estéril, a placa foi acondicionada na posição 1 do suporte acrílico do dispositivo de Leds e assim a luz foi incidida pela porção inferior da placa. Durante o experimento o ambiente foi mantido escuro.

Foram realizados os seguintes grupos: (Controle) sem nenhuma intervenção, (L+) irradiado sem infecção; (Queimadura + Infecção) queimadura e infecção, (Queim. + Infec. + AM+ L+) queimadura e infecção submetidas à TFDa mediada por AM; (Queim. + Infec. + FTC+ L+) queimadura e infecção submetidas a TFDa mediada por FTC. Cada grupo composto por 10 larvas, totalizando 50 larvas. Os ensaios foram realizados em duplicata.

### **3.8.4 Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella***

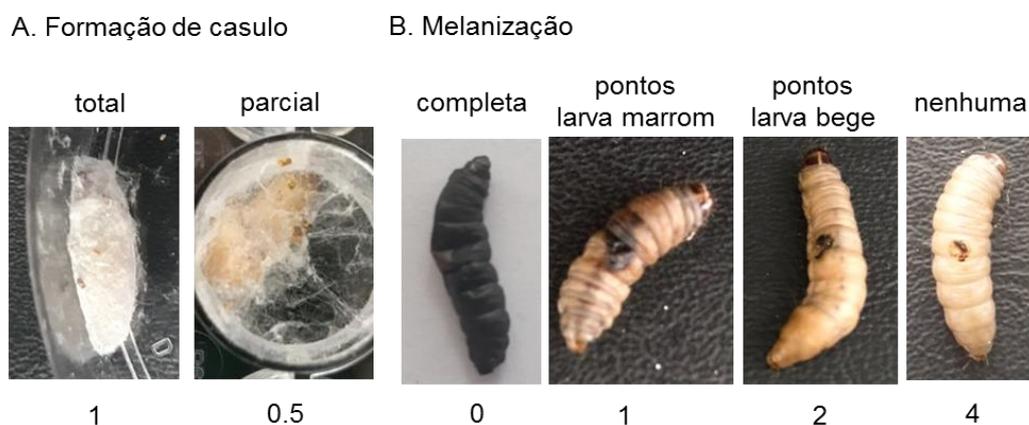
Após a realização da TFDa, as larvas foram acondicionadas em placas de 24 poços, incubadas a 37°C no escuro e analisadas, diariamente, ao longo do curso de 120 h (5 dias). O número de larvas mortas foi anotado diariamente para realização da curva de sobrevivência. Foram consideradas mortas larvas que não apresentaram nenhum movimento ao toque por uma pinça metálica. Os animais mortos, assim que identificados, foram removidos do grupo.

### **3.8.5 Índice de saúde das larvas de *G. mellonella***

As larvas foram monitoradas conforme um sistema de pontuação patológica proposto por Loh et al. (2013) para os seguintes atributos: atividade de movimentação, extensão da produção de seda (formação de casulo) (Figura 9A), melanização (Figura 9B) e sobrevivência. Para cada atributo foi fornecida uma pontuação (Quadro 3), a somatória dos pontos corresponde a um índice geral de saúde da larva. Larvas saudáveis pontuam entre 9 e 10, larvas mortas infectadas pontuam 0.

As pontuações médias obtidas para cada atributo analisado: atividade de movimentação, formação do casulo e melanização, foram transformadas em porcentagens de 100% e representadas graficamente. Alta atividade e movimentação espontânea são características de larvas saudáveis. Já a melanização está relacionada com a resposta imune a algum processo infeccioso.

Figura 9 – Aparência da larva após a infecção e sua pontuação no índice de saúde



Legenda: a) Formação de casulo; b) Progressão de melanização da larva da direita (nenhuma) para a esquerda (completa).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Quadro 3 - Sistema de pontuação do índice de saúde

<b>Categoria</b>	<b>Descrição</b>	<b>Pontuação</b>
Atividade	Sem atividade	0
	Atividade mínima na estimulação	1
	Atividade na estimulação	2
	Atividade sem estimulação	3
Formação de casulo	Sem casulo	0
	Casulo parcial	0,5
	Casulo completo	1
Melanização	Melanização completa (preta)	0
	Pontos escuros na larva marrom	1
	≥ 3 pontos na larva bege	2
	< 3 pontos na larva bege	3
	Sem melanização	4
Sobrevivência	Morta	0
	Viva	2

Fonte: Loh et al., 2013.

### 3.9 Análise dos resultados obtidos

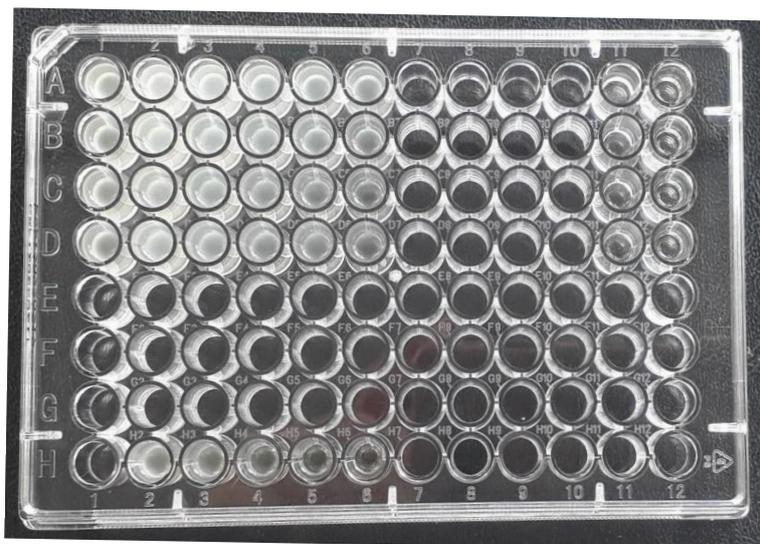
Os dados obtidos foram submetidos à análise para a seleção do teste estatístico mais adequado para cada experimento. Nos testes de culturas planctônicas e biofilmes, bem como no índice de saúde das larvas de *G. mellonella*, para os dados paramétricos, foi utilizada a análise de variância de ANOVA seguida do teste de Tukey. Para os ensaios de curva de sobrevivência em *G. mellonella*, foram utilizados o método Kaplan-Meier e o nível de significância foi calculado através do teste Log-rank (Mantel-Cox). Em todos os ensaios experimentais realizados foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0, com nível de significância de 5%.

## 4 RESULTADO

### 4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana do Farnesol por meio do teste de CIM

No teste de microdiluição em caldo, todas as concentrações testadas de Farnesol (0,25, 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 mM) não inibiram o crescimento de *A. baumannii* (Figura 10), demonstrando ausência de atividade antimicrobiana. Desse modo, a concentração de 4 mM foi adotada para o estudo dos efeitos potencializadores do Farnesol na TFDa.

Figura 10 - Placa de 96 poços para determinação da CIM do Farnesol



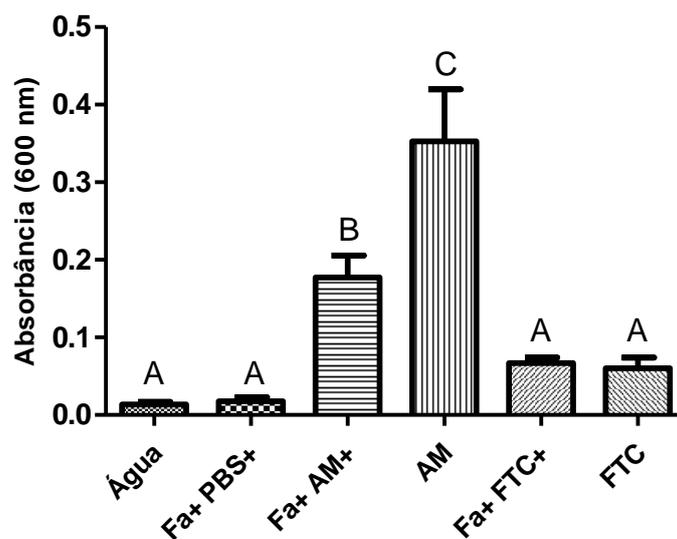
Legenda: A coluna 1 corresponde ao controle negativo, sem o uso do Farnesol. As colunas de 2 a 6 indicam as diferentes concentrações de Farnesol testadas respectivamente (4,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25 mM). Na coluna 11 está o controle de esterilidade do veículo, com meio de cultura e o veículo de diluição do Farnesol. Na coluna 12, está o controle de esterilidade do meio de cultura, somente com o meio de cultura. A linha A corresponde a cepa ATCC 18804, linha B cepa clínica A1, linha C a cepa A2 e linha D a cepa A4. Já na linha H, a partir da coluna 2 está o controle de turbidez do Farnesol em diluições seriadas, sem *A. baumannii*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

## 4.2 Análise dos efeitos do Farnesol sobre a absorção do AM e FTC pelas células de *A. baumannii* (ATCC 19606)

A absorção do AM (0,1 mg/mL) e do FTC (0,4 mg/mL) pelas células de *A. baumannii* foi avaliada em dois grupos diferentes, pré-tratados ou não com Farnesol, a fim de verificar se o Farnesol poderia interferir na permeabilidade da membrana celular e potencializar a absorção dos fotossensibilizadores na célula de *A. baumannii* (Figura 11).

Figura 11 - Valores de absorbância (600 nm) indicando absorção do AM e do FTC pela membrana da célula de *A. baumannii* (ATCC 19606)



Legenda: (Água) *A. baumannii* e água destilada estéril; (Fa+ PBS+) *A. baumannii*, Farnesol e PBS; (Fa+ AM+) *A. baumannii*, Farnesol e AM; (AM) *A. baumannii* e AM; (Fa+ FTC+) *A. baumannii*, Farnesol e FTC; (FTC) *A. baumannii* e FTC. ( $p < 0,0001$ ). Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos

Fonte: Elaborada pelo autor.

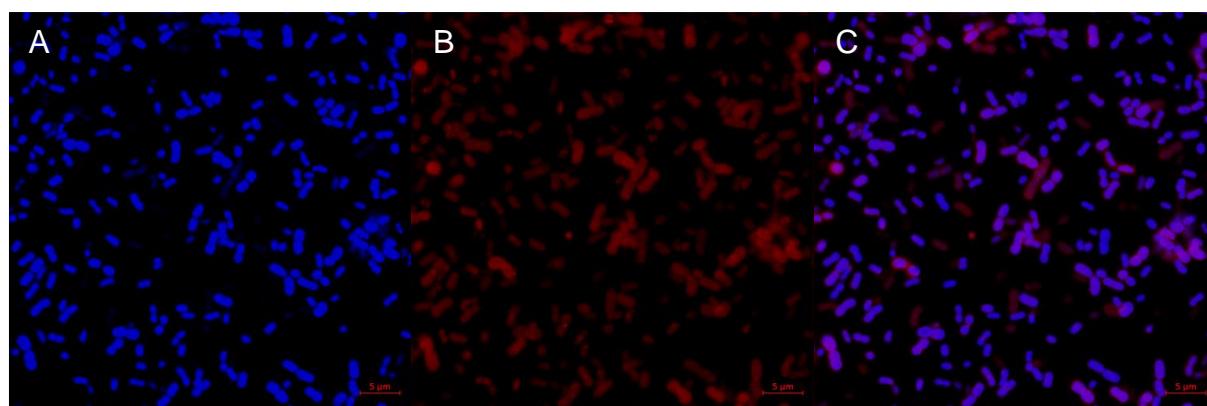
Quando observados os resultados, verificou-se que o grupo tratado com AM sem associação de Farnesol apresentou valores de absorção superiores ao grupo tratado com AM associado ao Farnesol ( $p < 0,0001$ ). Com relação ao FTC, o grupo

tratado com FTC sem a associação do Farnesol mostrou valores de absorção semelhantes ao grupo tratado com FTC associado ao Farnesol. Esses resultados indicaram que o pré-tratamento com Farnesol não foi capaz de aumentar a permeabilidade da célula de *A. baumannii* ao AM e ao FTC.

#### 4.3 Análise por Microscopia Confocal da internalização do AM e FTC pelas células de *A. baumannii* (ATCC 19606)

A internalização dos fotossensibilizadores (AM e FTC) pelas células de *A. baumannii* foi avaliada por fluorescência em Microscopia Confocal. Nas imagens obtidas para o AM (Figura 12) e FTC (Figura 13), foi possível observar a morfologia das células bacterianas por meio do DAPI coradas em azul (Figuras 12A e 13A), a presença do fotossensibilizador no interior das células de *A. baumannii* em vermelho (Figuras 12B e 13B) e as imagens sobrepostas (Figuras 12C e 13C). Com essa análise foi possível verificar que tanto o AM, como o FTC foram capazes de internalizar nas células de *A. baumannii* em culturas planctônicas.

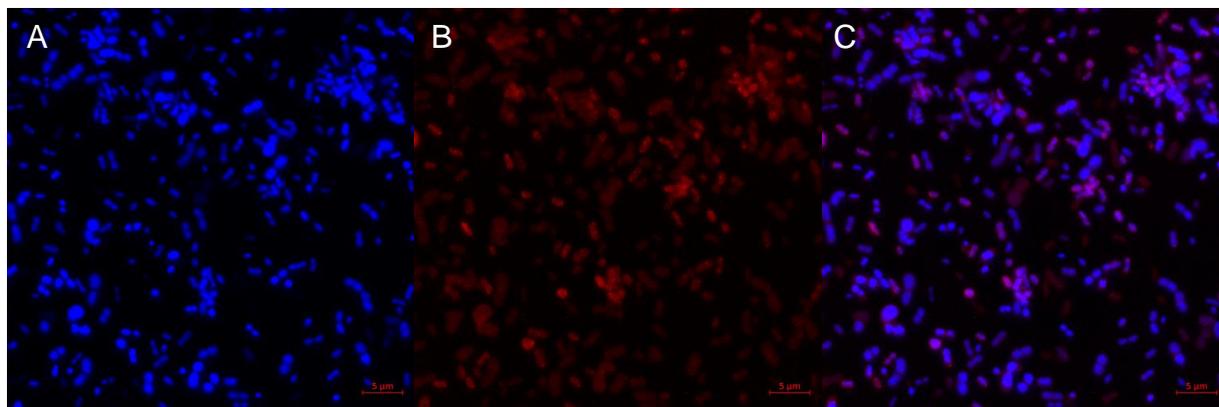
Figura 12 – Microscopia Confocal da internalização do AM pelas células bacterianas de *A. baumannii* (ATCC 19606)



Legenda: a) Células de *A. baumannii* com DAPI; b) Internalização de AM pelas células de *A. baumannii*; c) As duas imagens sobrepostas, DAPI e AM.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 13 – Microscopia Confocal da internalização do FTC pelas células bacterianas de *A. baumannii* (ATCC 19606)



Legenda: a) Células de *A. baumannii* com DAPI; b) Internalização do FTC pelas células de *A. baumannii*; c) As duas imagens sobrepostas, DAPI e FTC.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.4 Estudo da TFDa em culturas planctônicas

##### 4.4.1. Aplicação da TFDa com uso de Laser, AM, FTC e Farnesol sobre culturas planctônicas de *A. baumannii*

Inicialmente, foram realizados testes de TFDa mediada por AM (0,1 mg/mL) com associação ou não de Farnesol.

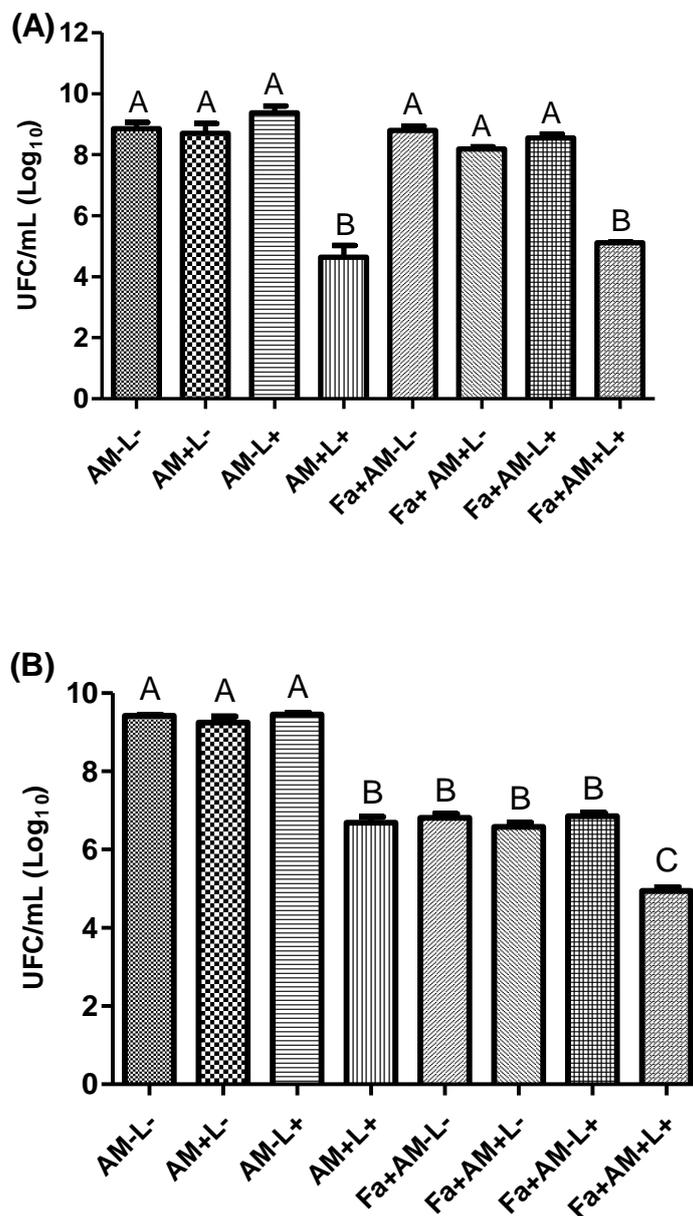
Em relação aos testes com a cepa ATCC de *A. baumannii* sem associação do Farnesol, verificou-se que a TFDa com AM (AM+ L+) levou a uma redução na contagem de UFC/mL comparado ao grupo controle (AM- L-), com diminuição de aproximadamente 4 log. Quando a TFDa foi associada ao Farnesol, o grupo pré-tratado com Farnesol (Fa+ AM+ L+) também apresentou redução do número de UFC/mL de *A. baumannii* em relação ao controle (Fa+ AM- L-), sendo essa redução em torno de 3 log (Figura 14A). Esses dados sugerem que a TFDa com AM foi efetiva no controle antimicrobiano da cepa ATCC de *A. baumannii* independentemente da associação ou não ao Farnesol.

Comparando-se os grupos de TFDa com AM pré-tratados (Fa+ AM+ L+) ou não com Farnesol (AM+ L+), não foi observada diferença estatisticamente significativa entre eles.

Também foi avaliada a resposta da cepa clínica A1 de *A. baumannii* à TFDa. Sem associação do Farnesol verificou-se que a TFDa com AM (AM+ L+) reduziu a contagem de UFC/mL comparada ao grupo controle (AM- L-) (Figura 14B), com diminuição de aproximadamente 3 log. Quando a TFDa foi associada ao Farnesol (Fa+ AM+ L+) houve redução do número de UFC/mL de *A. baumannii* em relação ao controle (Fa+AM-L-), cerca de 2 log.

Analisando os grupos de TFDa com AM pré-tratados (Fa+ AM+ L+) ou não com Farnesol (AM+ L+), observou-se diferença estatisticamente significativa entre eles. Porém, o grupo controle pré-tratado com Farnesol (Fa+ AM- L-) também apresentou contagem reduzida de UFC/mL em relação ao grupo controle sem Farnesol (AM- L-).

Figura 14 – TFDa sobre culturas planctônicas de *A. baumannii* cepa ATCC (A) e cepa clínica A1 (B), utilizando-se AM como fotossensibilizador e Farnesol associado a terapia

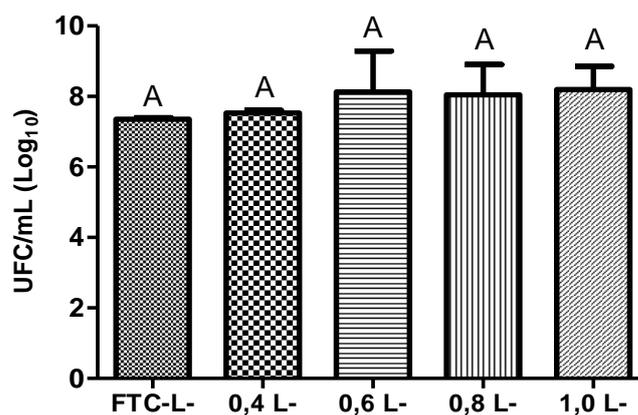


Legenda: a) Cepa ATCC de *A. baumannii*; b) Cepa clínica A1 de *A. baumannii*; (AM-L-) Ausência de AM e luz; (AM+L-) AM sem luz; (AM-L+) Ausência de AM com luz; (AM+L+) AM com luz; (Fa+AM-L-) apenas Farnesol; (Fa+AM+L-) Farnesol e AM sem Laser; (Fa+AM-L+) Farnesol e luz sem AM; (Fa+AM+L+) Farnesol, AM e luz. ( $p < 0,0001$ ). Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o estudo da TFDa com uso do FTC como fotossensibilizador, foi necessário realizar o teste de toxicidade no escuro do FTC sobre as culturas planctônicas de *A. baumannii* (ATCC 19606). As células foram tratadas com FTC em diferentes concentrações sem irradiação de luz. Observou-se que nenhuma das concentrações testadas (0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg/mL) inibiram o crescimento bacteriano (Figura 15). Ou seja, as concentrações não foram tóxicas para as células de *A. baumannii* quando comparadas ao grupo controle.

Figura 15 – Médias e desvio-padrão de UFC/mL de *A. baumannii* no teste de toxicidade do FTC no escuro sobre culturas planctônicas

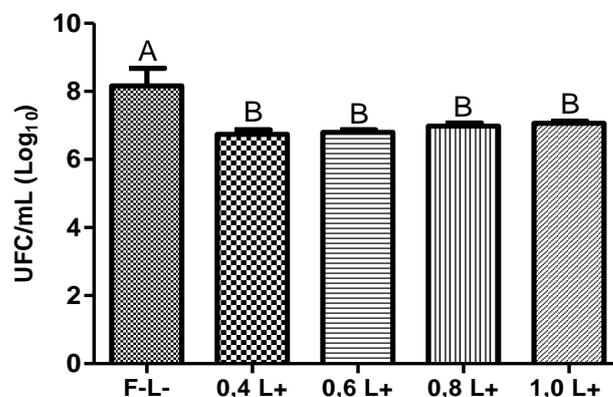


Legenda: (FTC-L-) Ausência de FTC e luz; (0,4 L-) FTC a 0,4 mg/mL sem luz; (0,6 L-) FTC a 0,6 mg/mL sem luz; (0,8 L-) FTC a 0,8 mg/mL sem luz; (1,0 L-) FTC a 1,0 mg/mL sem luz. ( $p=0,8774$ ). Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Depois de verificada a toxicidade do FTC no escuro, a próxima análise foi verificar os efeitos do FTC na TFDa com Laser sobre culturas de *A. baumannii* ATCC 19606. Foram testadas diferentes concentrações de FTC (0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg/mL) associadas à irradiação Laser. Verificou-se que todas as concentrações testadas foram efetivas na redução bacteriana de *A. baumannii* com redução de até 2 log, porém não apresentaram diferença estaticamente significativa entre elas (Figura 16). Esses dados sugerem que o FTC teve ação antimicrobiana na TFDa contra *A. baumannii* em crescimento planctônico.

Figura 16 – Médias e desvio-padrão de UFC/mL de *A. baumannii* obtidos no teste com diferentes concentrações de FTC na TFDa

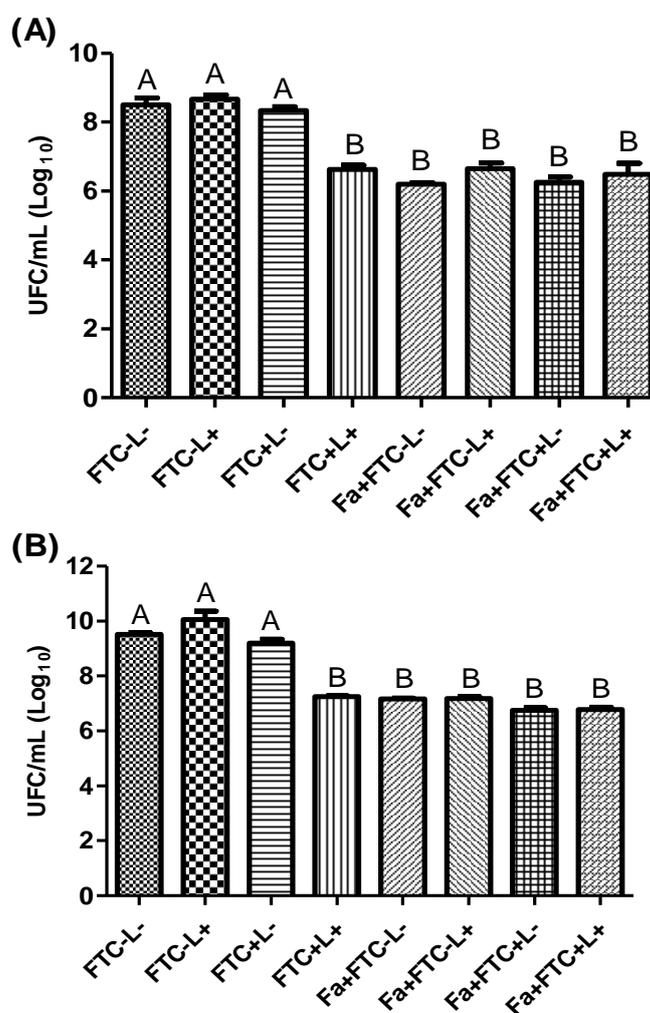


Legenda: (F-L-) Ausência de fotossensibilizador e Laser; (0,4 L+) FTC a 0,4 mg/mL com Laser; (0,6 L+) FTC a 0,6 mg/mL com Laser; (0,8 L+) FTC a 0,8 mg/mL com Laser; (1,0 L+) FTC a 1,0 mg/mL com Laser. ( $p=0,0035$ ). Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

Em seguida foi avaliado o efeito do Farnesol associado ou não à TFDa, mediada pelo FTC na concentração de 0,4 mg/mL em culturas planctônicas de *A. baumannii* cepa ATCC e cepa A1. (Figura 17). Para a cepa ATCC, observou-se que o grupo submetido à TFDa (FTC+ L+), quando comparado ao grupo controle (FTC-L-), mostrou uma redução de 2 log, indicando ação dessa terapia sobre as culturas planctônicas. Já nos grupos previamente tratados com Farnesol, o grupo controle (Fa+ FTC- L-) e o grupo com TFDa (Fa+ FTC+ L+) não apresentaram diferença estatística na contagem de UFC/mL (Figura 17A).

Para a cepa clínica A1, o grupo submetido à TFDa sem Farnesol (FTC+ L+) apresentou redução de 2 log quando comparado ao grupo controle (F- L-), o que sugere a ação antibacteriana da TFDa. No entanto, nos grupos tratados com Farnesol, o grupo controle (Fa+ FTC- L-) não apresentou diferença estatística na contagem de UFC/mL comparado ao grupo TFDa (Fa+ FTC+ L+) (Figura 17B).

Figura 17 - Médias e desvio-padrão de UFC/mL do teste de TFDa sobre culturas planctônicas de *A. baumannii* cepa ATCC (A) e cepa clínica A1 (B), utilizando FTC como fotossensibilizador e Farnesol associado a terapia



Legenda: a) Cepa ATCC de *A. baumannii*; b) Cepa clínica A1 de *A. baumannii*; (FTC-L-) Ausência de FTC e luz; (FTC+L-) FTC sem luz; (FTC-L+) Ausência de FTC com luz; (FTC+L+) FTC com luz; (Fa+FTC-L-) apenas Farnesol; (Fa+FTC+L-) Farnesol e FTC sem luz; (Fa+FTC-L+) Farnesol e luz sem FTC; (Fa+FTC+L+) Farnesol, FTC e luz. ( $p < 0,0001$ ). Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em síntese, os resultados dos ensaios em culturas planctônicas demonstraram que a ação do Farnesol na TFDa foi cepa dependente. Desse modo,

os ensaios seguintes em culturas planctônicas, biofilmes e em modelo de *G. mellonella* foram realizados sem o uso do Farnesol.

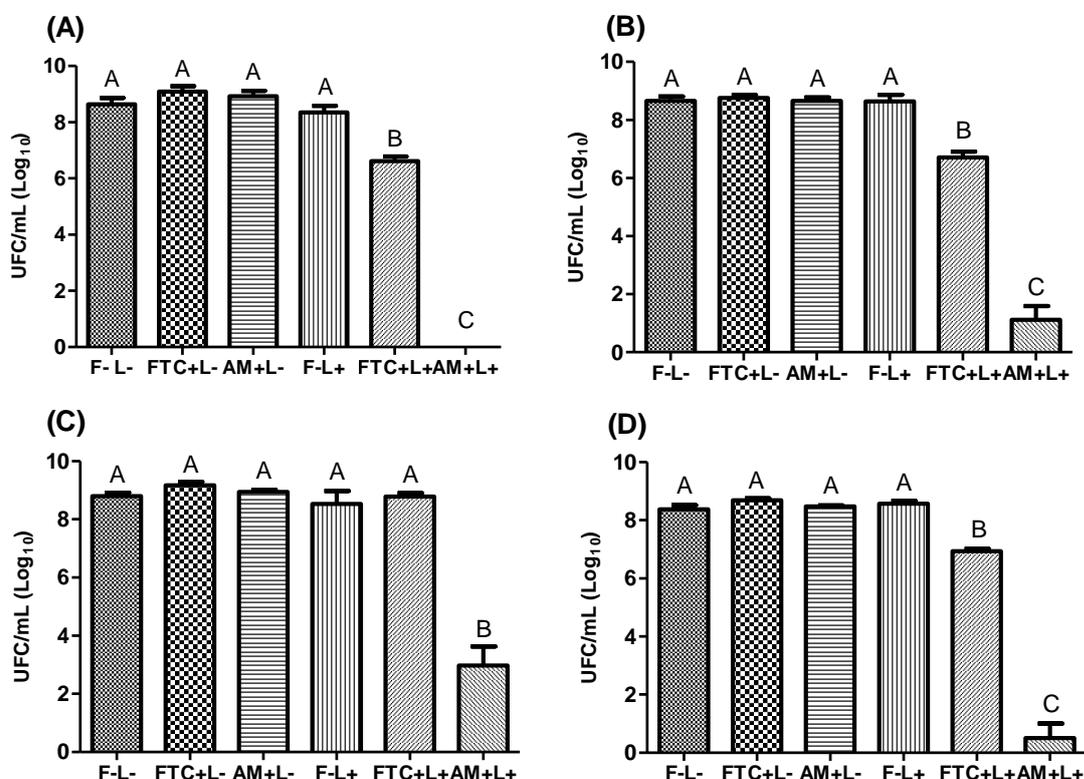
#### **4.4.2 Aplicação da TFDa com uso de Led, AM e FTC sobre culturas planctônicas de *A. baumannii***

Foi avaliado nesse estudo a ação da TFDa com o dispositivo de Leds, mediada pelo AM e FTC, sobre as cepas de *A. baumannii* em culturas planctônicas.

Foram avaliadas as cepas ATCC (Figura 18A), clínica A1 (Figura 18B), clínica A2 (Figura 18C) e clínica A4 (Figura 18D). Entre as cepas analisadas, o grupo TFDa com FTC (FTC+ L+), comparado ao grupo controle (F- L-), apresentou decréscimo de crescimento nas cepas ATCC, A1 e A4, em cerca 2 log. Somente a cepa A2 apresentou um perfil diferente, sem diferença estatística significativa entre o grupo com FTC (FTC+ L+) e o controle (F- L-). Com relação à TFDa mediada por AM todas as cepas apresentaram redução do crescimento bacteriano no grupo tratado (AM+ L+) comparado ao controle, sendo que essas reduções variaram de 6 log até inibição total do crescimento.

Quando comparados o grupo tratado com FTC (FTC+ L+) das cepas testadas e o grupo com AM (AM+ L+) respectivo de cada cepa, houve diferença estatística significativa entre eles. Esse resultado sugere que a TFDa mediada por AM apresentou maior efetividade na redução do crescimento bacteriano dentro dos parâmetros testados nesse estudo. Assim, foi possível verificar que o fotossensibilizador AM, já utilizado de maneira convencional para mediar a TFDa apresentou melhor ação antibacteriana que o novo FTC, tanto na cepa ATCC quanto as cepas clínicas em crescimento planctônico.

Figura 18 - TFDa com Leds sobre culturas planctônicas de *A. baumannii* cepa ATCC, cepa clínica A1, A2 e A4, utilizando AM e FTC como fotossensibilizadores



Legenda: a) Cepa ATCC de *A. baumannii*; b) Cepa clínica A1 de *A. baumannii*; c) Cepa clínica A2 de *A. baumannii*; d) Cepa clínica A4 de *A. baumannii*; (F-L-) Ausência de fotossensibilizador e luz; (FTC+L-) FTC sem luz; (AM+L-) AM sem luz; (F-L+) Ausência de fotossensibilizador com luz; (FTC+L+) FTC com luz; (AM+L+) AM e luz. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,0001$ ).

Fonte: Elaborada pelo autor.

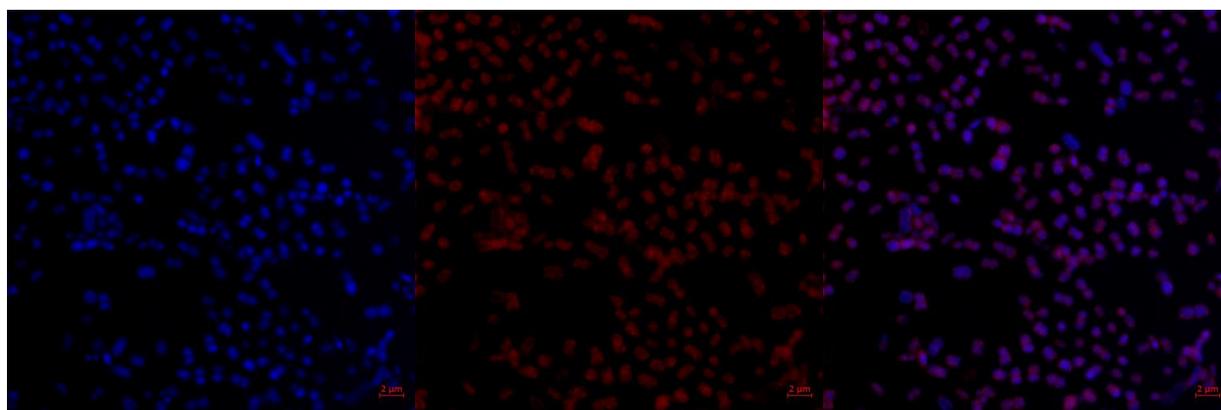
## 4.5 Estudo da TFDa em biofilmes

### 4.5.1 Análise por Microscopia Confocal da internalização dos fotossensibilizadores em células de *A. baumannii* (ATCC 19606) em biofilmes

A internalização do AM e FTC pelas células de *A. baumannii* em biofilmes foi avaliada por fluorescência em microscopia Confocal. As imagens obtidas para os fotossensibilizadores AM e FTC estão apresentadas, respectivamente, nas Figuras 19

e 20. Em cada figura, é possível observar a morfologia das células bacterianas por meio do DAPI coradas em azul (Figuras 19A e 20A), a presença do fotossensibilizador no interior das células de *A. baumannii* em vermelho (Figuras 19B e 20B) e as duas imagens sobrepostas (Figuras 19C e 20C). Diante desses resultados, verificou-se que ambos os fotossensibilizadores foram capazes de internalizar nas células de *A. baumannii* mesmo essas estando organizadas em biofilmes.

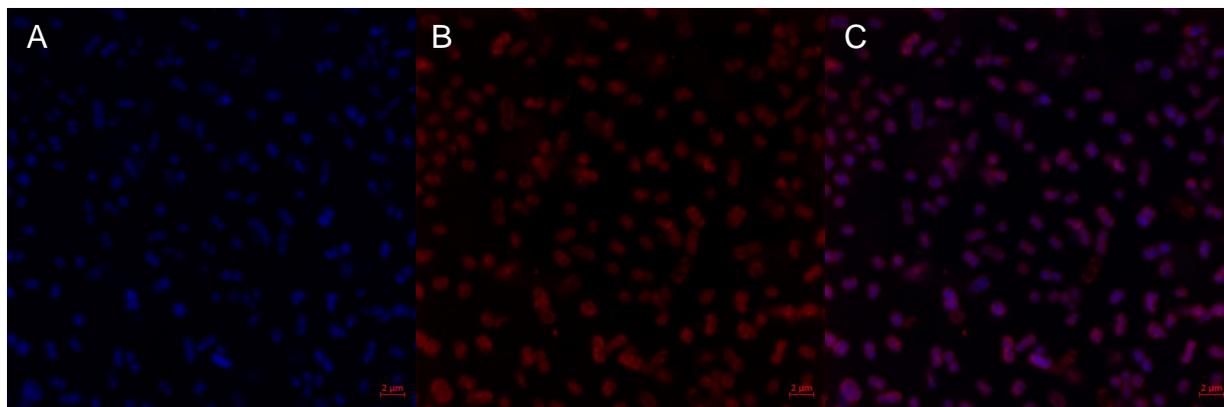
Figura 19 – Microscopia confocal da internalização do AM pelas células do biofilme de *A. baumannii* (ATCC 19606)



Legenda: a) Células de *A. baumannii* com prolong DAPI; b) Internalização do AM pelas células de *A. baumannii*; c) As duas imagens sobrepostas, DAPI e AM.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 20 – Microscopia confocal da internalização do FTC pelas células do biofilme de *A. baumannii* (ATCC 19606)



Legenda: a) Células de *A. baumannii* com prolong DAPI; b) Internalização do FTC pelas células de *A. baumannii*; c) As duas imagens sobrepostas, DAPI e Azul de FTC.

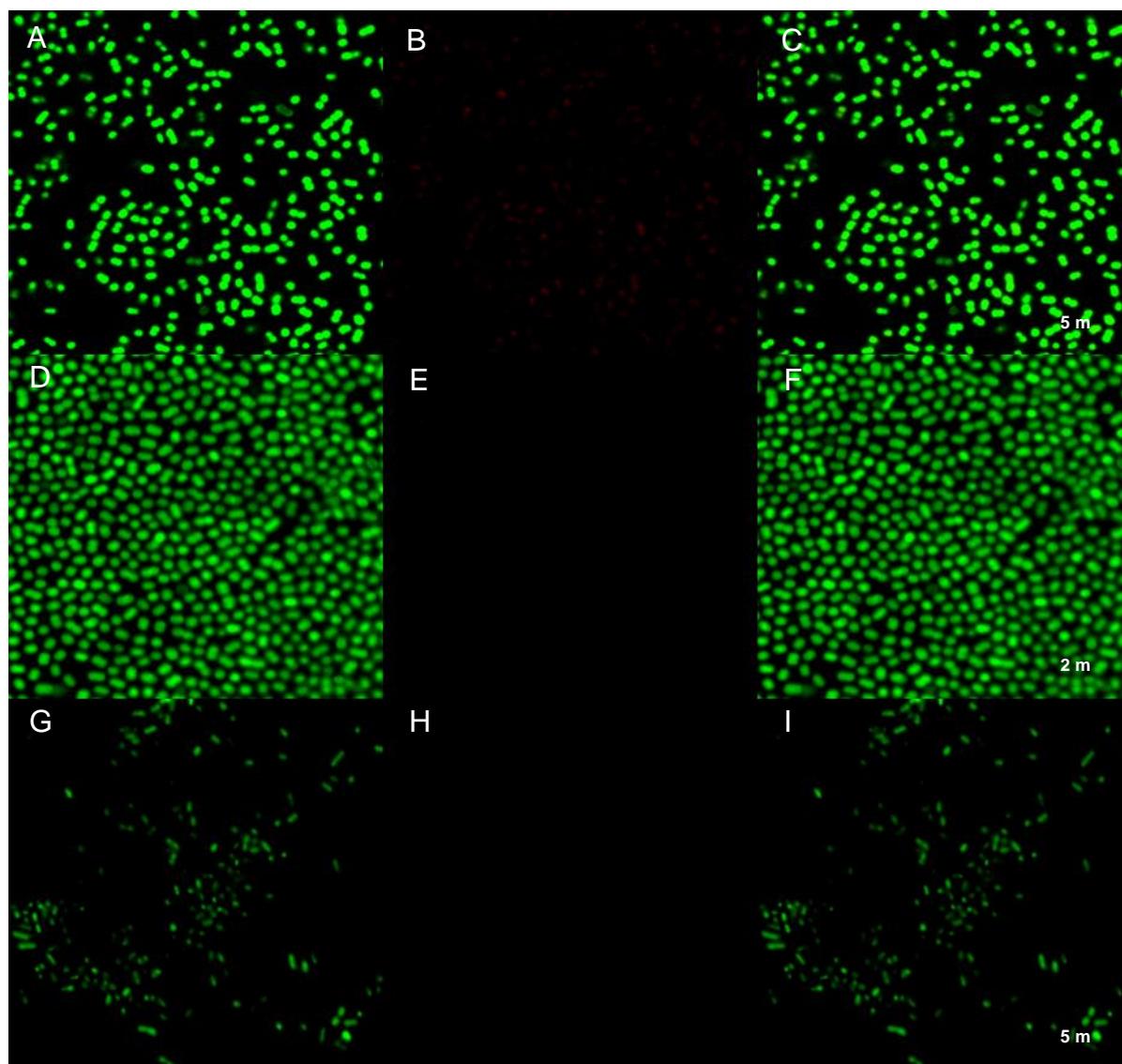
Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.5.2 Análise de viabilidade celular por fluorescência em Microscopia Confocal das células de *A. baumannii* (ATCC 19606) em biofilmes

A viabilidade celular bacteriana do biofilme de *A. baumannii*, após o intervalo de 4 horas da aplicação da TFDa mediada por AM ou FTC, foi avaliada de maneira qualitativa pelo teste de fluorescência em microscopia Confocal. A primeira análise foi sobre os grupos sem irradiação (Figura 21), na qual procurou-se observar a morfologia das células bacterianas viáveis coradas em verde (Figura 21A, 21D e 21G), as células com dano na membrana coradas em vermelho (Figura 21B, 21E e 21H) e as duas imagens sobrepostas (Figura 21C, 21F e 21I).

Na sequência, foi realizada a análise dos grupos submetidos a irradiação Led (30 J/cm<sup>2</sup>) (Figura 22). Foi possível observar a morfologia das células bacterianas viáveis coradas em verde (Figura 22A, 22D e 22G), as células com dano na membrana coradas em vermelho (Figura 22B, 22E e 22H) e as duas imagens sobrepostas (Figura 22C, 22F e 22I).

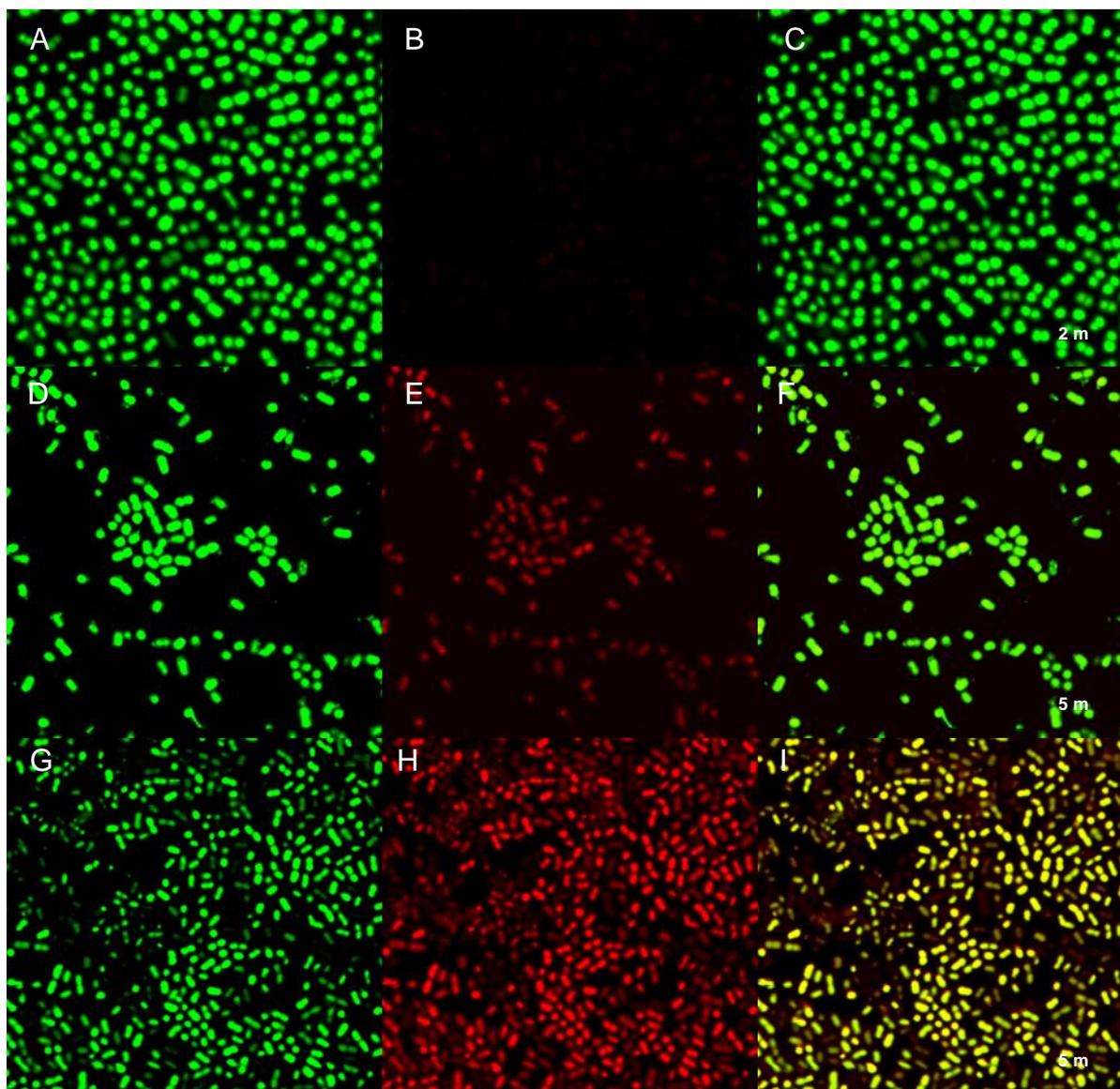
Figura 21 - Análise qualitativa em Microscopia Confocal da viabilidade celular do biofilme de *A. baumannii* (ATCC 19606) para os grupos controle no escuro



Legenda: a, d, g) Células de *A. baumannii* viáveis com fluorescência em verde, respectivamente (F-L-) ausência de luz, (AM+ L-) AM sem luz, (FTC+ L-) FTC sem luz; b, e, h) Células de *A. baumannii* com dano na membrana em vermelho, respectivamente (F- L-) ausência de luz, (AM+ L-) AM sem luz, (FTC+ L-) FTC sem luz; c, f, i) As duas imagens sobrepostas, respectivamente (F- L-) ausência de luz, (AM+ L-) AM sem luz, (FTC+ L-) FTC sem luz.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 22 – Análise qualitativa em microscopia Confocal da viabilidade celular do biofilme de *A. baumannii* (ATCC 19606) para os grupos experimentais submetidos a irradiação Led



Legenda: a, d, g) Células de *A. baumannii* viáveis com fluorescência em verde, respectivamente (F-L+) ausência de fotossensibilizador com luz, (AM+ L+) AM e luz, (FTC+ L+) FTC e luz; b, e, h) Células de *A. baumannii* com dano na membrana em vermelho, respectivamente (F-L+) ausência de fotossensibilizador com luz, (AM+ L+) AM e luz, (FTC+ L+) FTC e luz; c, f, i) As duas imagens sobrepostas, respectivamente (F- L+) ausência de fotossensibilizador com luz, (AM+ L+) AM e luz, (FTC+ L+) FTC e luz;

Fonte: Elaborada pelo autor.

Foi possível observar nas imagens que os grupos submetidos à TFDa mediados por AM ou FTC (AM+ L+; FTC+ L+) apresentaram maior intensidade de

células com danos na membrana, coradas em vermelho, quando comparados aos grupos controles não tratados. Esses dados sugerem que a TFDa promoveu danos à membrana das células de *A. baumannii* após 4 h da irradiação, podendo levá-las ao processo de morte.

#### 4.5.3 Análise da contagem de UFC/mL de *A. baumannii* em biofilmes

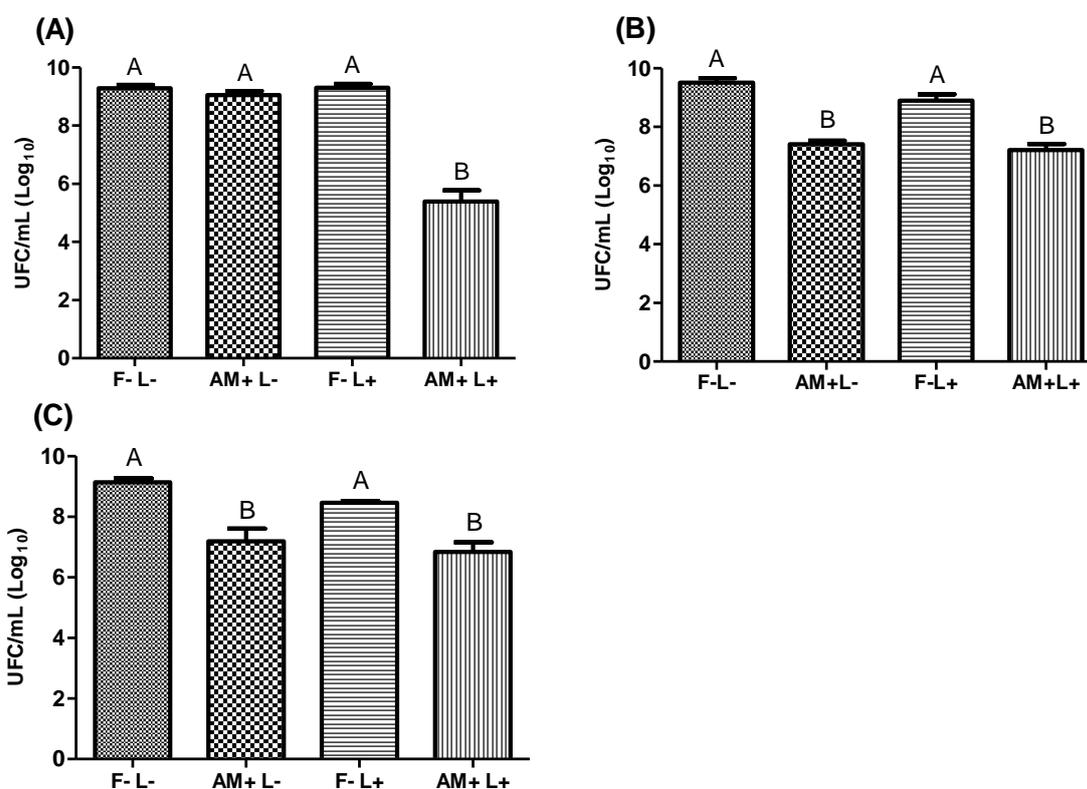
Nesse ensaio foi avaliada a ação da TFDa com o dispositivo de Leds, mediada pelo AM e FTC, sobre o biofilme da cepa ATCC de *A. baumannii*. Primeiramente, foi avaliada a TFDa com o AM como fotossensibilizador. Diferentes concentrações de AM foram testadas a fim de selecionar a mais efetiva na TFDa sobre as células de *A. baumannii* em biofilme (Figura 23).

Foram avaliadas as seguintes concentrações de AM: 0,2 mg/mL (Figura 23A), 0,25 mg/mL (Figura 23B) e 0,3 mg/mL (Figura 23C). O grupo TFDa mediado pelo AM (AM+ L+), comparado ao grupo controle (F- L-), apresentou decréscimo de crescimento bacteriano na concentração de AM de 0,2, 0,25 e 0,3 mg/mL, respectivamente, de 4, 2 e 3 log, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Porém, as concentrações de 0,25 e 0,3 mg/mL de AM apresentaram citotoxicidade no escuro, já que o grupo sem irradiação (AM+ L-) de ambas apresentou redução de células bacterianas de 2 log quando comparado ao controle (F- L-). Assim a concentração de AM de 0,2 mg/mL foi selecionada para dar continuidade no estudo da TFDa em biofilme de *A. baumannii*.

Após definida a concentração de AM a ser utilizada nos ensaios de TFDa, foram testadas diferentes densidades de energia (Figura 24). As densidades de energia testadas foram 30 J/cm<sup>2</sup> e 45 J/cm<sup>2</sup>. O grupo TFDa mediado pelo AM com densidade de energia de 30 J/cm<sup>2</sup> (AM+ L+ 30) comparado ao grupo controle (F-L-) apresentou redução de crescimento bacteriano de 3 log, com diferença estatística significativa entre os grupos. Já o grupo submetido a TFDa com AM e densidade de energia de 45 J/cm<sup>2</sup> (AM+ L+ 45) apresentou redução de cerca de 2 log, também com diferença estatística significativa perante o grupo controle (F- L-).

Quando os dois grupos de TFDa foram submetidos a análise estatística não apresentaram diferença significativa entre eles, assim a densidade de energia selecionada para dar continuidade aos estudos de TFDa foi de 30 J/cm<sup>2</sup>.

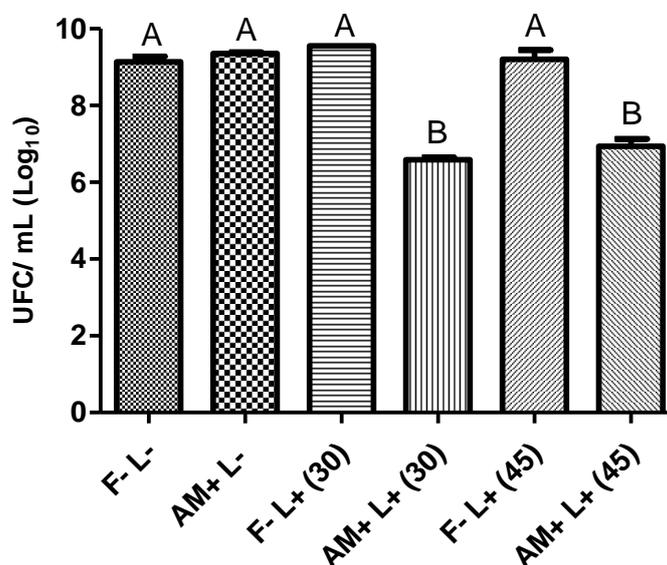
Figura 23 - Médias e desvio-padrão de UFC/mL obtidos no teste de TFDa com Leds sobre biofilme de *A. baumannii* cepa ATCC utilizando AM como fotossensibilizador



Legenda: a) Cepa ATCC de *A. baumannii* TFDs com AM 0,2 mg/ mL ( $p < 0,0001$ ); b) Cepa ATCC de *A. baumannii* TFDs com AM 0,25 mg/ mL ( $p < 0,0001$ ) c) Cepa ATCC de *A. baumannii* TFDs com AM 0,3 mg/ mL; (F- L-) Ausência de fotossensibilizador e luz; (AM+ L-) AM sem luz; (F- L+) Ausência de fotossensibilizador com luz; (AM+ L+) AM e luz ( $p = 0,0034$ ). Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 24 - Médias e desvio-padrão de UFC/mL obtidos no teste de TFDa com Leds sobre biofilme de *A. baumannii* cepa ATCC com diferentes densidades de energia utilizando AM 0,2 mg/mL como fotossensibilizador

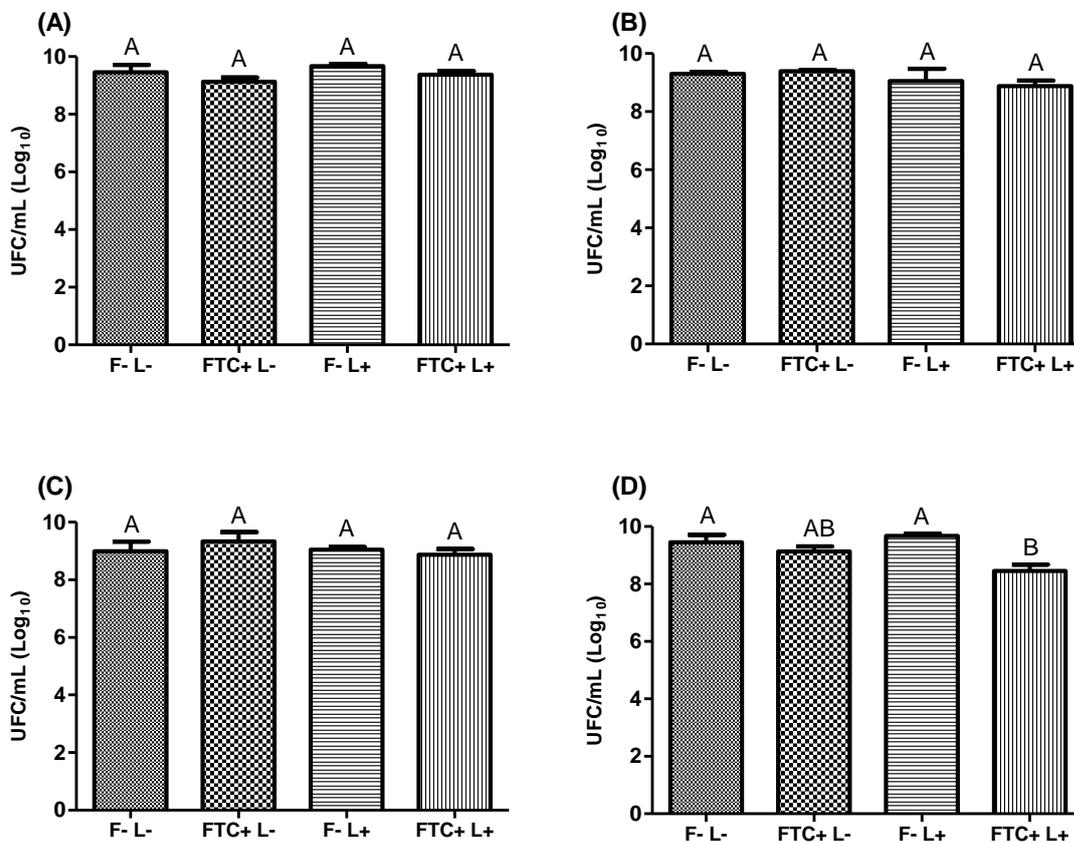


Legenda: (F- L-) Ausência de fotossensibilizador e luz; (AM+ L-) AM sem luz; (F- L+ 30) Ausência de fotossensibilizador com irradiação 30 J/ cm<sup>2</sup>; (AM+ L+ 30) AM e irradiação 30 J/ cm<sup>2</sup>; (F- L+ 45) Ausência de fotossensibilizador com irradiação 45 J/ cm<sup>2</sup>; (AM+ L+ 45) AM e irradiação 45 J/ cm<sup>2</sup>. (p<0,0001). Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a análise com AM, foi feito o ensaio de TFDa mediado pelo FTC. Diferentes concentrações de FTC foram testadas a fim de selecionar a mais efetiva na TFDa sobre as células de *A. baumannii* em biofilme (Figura 25).

Foram avaliadas concentrações de FTC a seguir: 0,8 mg/mL (Figura 25A), 1,0 mg/mL (Figura 25B), 1,2mg/mL (Figura 25C) e 1,6mg/mL (Figura 25D). Entre todas as concentrações testadas apenas o grupo TFDa mediado pelo FTC (FTC+L+) na concentração de 1,6 mg/mL, comparado ao grupo controle (F- L-), apresentou decréscimo de crescimento bacteriano de 1 log com diferença estatística significativa entre os grupos. Porém o uso de FTC na concentração de 1,6 mg/mL apresentou citotoxicidade no escuro, já que o grupo sem irradiação (FTC+ L-) apresentou redução de células bacterianas de 0,5 log quando comparado ao controle (F- L-). Com isso a concentração de 1,2 mg/mL de FTC foi selecionada para dar continuidade nos ensaios.

Figura 25 - Médias e desvio-padrão de UFC/mL obtidos no teste de TFDA com Leds sobre biofilme de *A. baumannii* cepa ATCC, utilizando FTC como fotossensibilizador



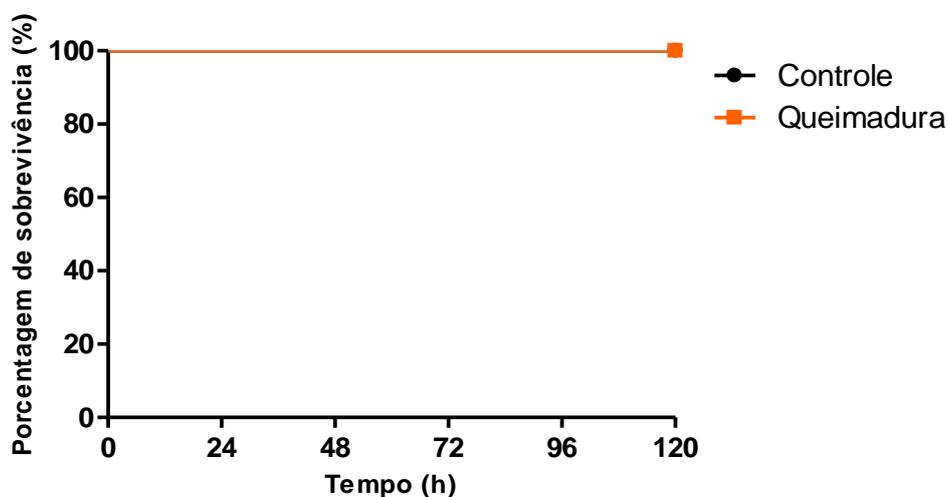
Legenda: a) Cepa ATCC de *A. baumannii* TFDA com FTC 0,8 mg/ MI ( $p=0,2397$ ); b) Cepa ATCC de *A. baumannii* TFDA com FTC 1,0 mg/ MI ( $p=0,4717$ ); c) Cepa ATCC de *A. baumannii* TFDA com FTC 1,2 mg/ MI ( $p=0,6469$ ); d) Cepa ATCC de *A. baumannii* TFDA com FTC 1,6 mg/ mL; (F- L-) Ausência de fotossensibilizador e luz; (FTC+ L-) FTC sem luz; (F- L+) Ausência de fotossensibilizador com luz; (FTC+ L+) FTC e luz ( $p=0,0106$ ). Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos. Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.6 Análise dos efeitos *in vivo* da TFDA sobre lesões de queimaduras em *G. mellonella* infectadas com *A. baumannii* (ATCC 19606)

#### 4.6.1 Curva de sobrevivência

Para a realização da TFDa em lesões de queimadura infectadas em *G. mellonella*, primeiro foi necessário padronizar o modelo de lesão de queimadura a ser utilizado. O grupo Controle composto por larvas sem nenhum procedimento e o grupo submetido à lesão de queimadura, mantiveram 100% de sobrevivência após as 120 h de análise (Figura 26), demonstrando que o método utilizado para indução da queimadura foi adequado para o estudo, pois levou a formação da lesão no dorso das larvas sem causar a morte.

Figura 26 – Curva de sobrevivência de *G. mellonella* para os grupos controle e grupo com lesão de queimadura



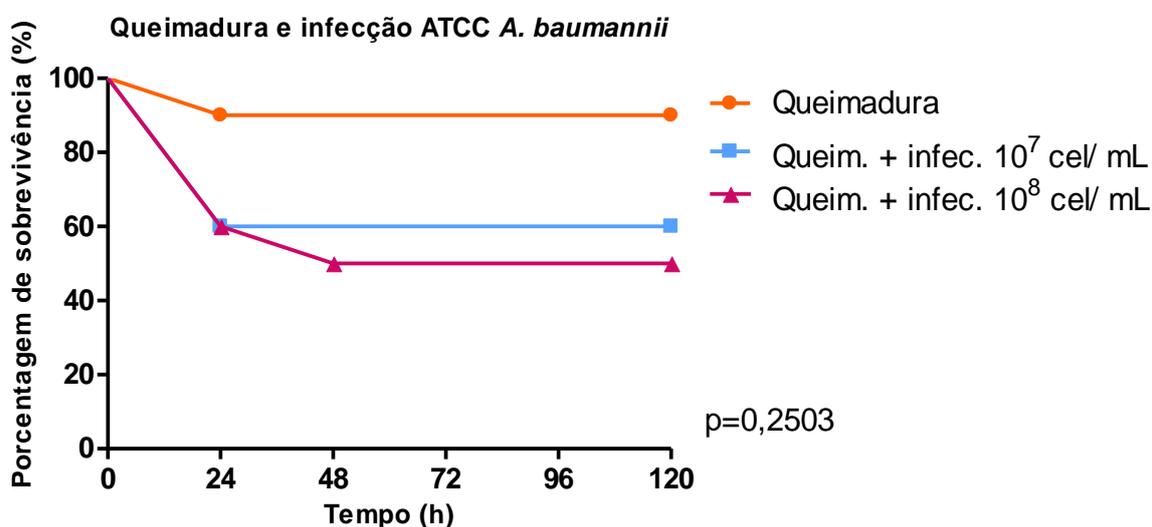
Legenda: p=1,0000.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A seguir, foi realizado o teste para infecção das lesões de queimaduras nas larvas. Foram testadas duas concentrações de suspensões padronizadas de *A. baumannii*,  $10^7$  cel/mL e  $10^8$  cel/mL (Figura 27). O grupo no qual a lesão de queimadura foi infectada com a suspensão de  $10^7$  cel/mL de *A. baumannii* apresentou

mortalidade de 40% das larvas, já o grupo infectado com a suspensão de  $10^8$  cel/mL de *A. baumannii* resultou numa mortalidade de 50%. Os dois grupos quando comparados estatisticamente não apresentaram diferença significativa entre eles ( $p=0,253$ ). Porém, como os ensaios visam analisar a efetividade da TFDa sobre a infecção nas larvas, a concentração de *A. baumannii* selecionada foi de  $10^8$  cel/mL que resultou em maior taxa de mortalidade.

Figura 27 - Curva de sobrevivência de *G. mellonella* com lesão de queimadura infectada por diferentes concentrações de *A. baumannii*



Legenda:  $p=0,2503$ .

Fonte: Elaborada pelo autor.

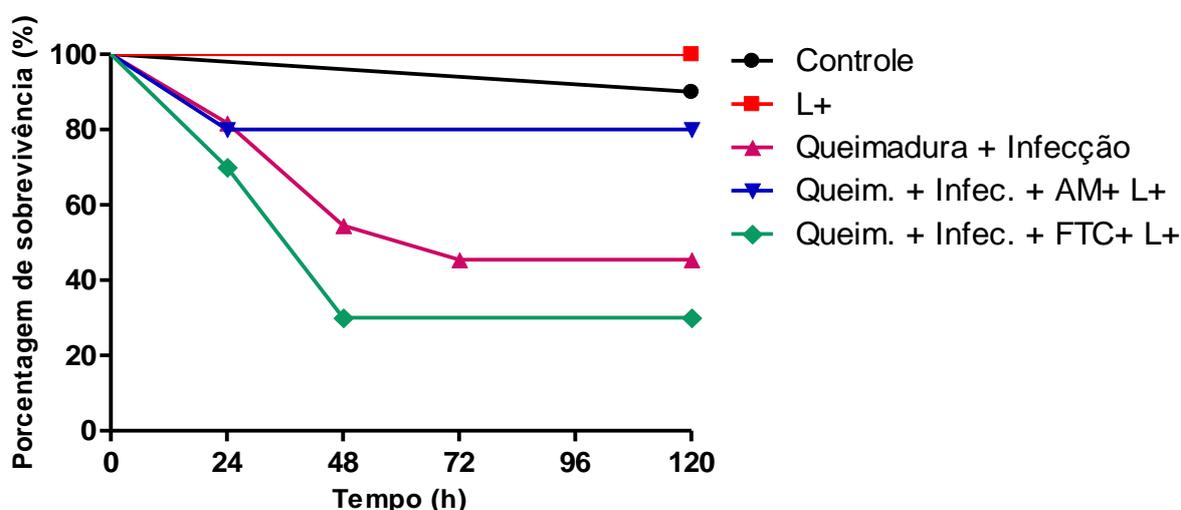
Seguida a padronização da lesão de queimadura em *G. mellonella* e a seleção da concentração de *A. baumannii* necessária para desenvolver a infecção nas larvas, foram realizados os ensaios de sobrevivência após a aplicação da TFDa mediada por AM ou FTC (Figura 28).

As larvas do grupo controle mantiveram 90% de sobrevivência durante os 5 dias de contagem, comprovando a saúde das larvas usadas no ensaio. O grupo L+, composto por larvas (sem queimaduras e sem infecção) apenas irradiadas com Leds ( $30 \text{ J/cm}^2$ ), apresentou 100% de sobrevivência, indicando que a irradiação utilizada nas

larvas não alterou o estado de saúde das mesmas.

O grupo Queimadura + Infecção obteve sobrevivência de 45% das larvas ao final do experimento. Com a aplicação da TFDa mediada por AM, a sobrevivência das larvas passou a ser de 80%. Já o uso da TFDa mediada por FTC resultou em sobrevivência de apenas 30% das larvas. Quando os grupos submetidos a TFDa mediada por AM (Queim. + Infec. + AM+ L+) e TFDa mediada por FTC (Queim. + Infec. + FTC+ L+) foram comparados ao grupo controle (Queimadura + Infecção), não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes. Assim, a TFDa mediada por AM nesses parâmetros testados, se mostrou efetiva na melhora da infecção por cepa ATCC de *A. baumannii* em lesão de queimadura no modelo de *G. mellonella*.

Figura 28 – Curva de sobrevivência de *G. mellonella* com lesão de queimadura infectada por *A. baumannii* submetida à TFDa



Legenda: (L+) irradiado; (Queim. + Infec. + AM+ L+) Queimadura com infecção submetida ao AM com luz; (Queim. + Infec. + FTC+ L+) Queimadura com infecção submetida ao FTC com luz. (p=0,0049).  
Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.6.2 Índice de saúde

Além da curva de sobrevivência de *G. mellonella*, foi analisado o estado de

saúde das larvas. Para isso, foi calculado a porcentagem das pontuações médias obtidas para os atributos atividade de movimentação, formação de casulo e melanização, durante os cinco dias de observação.

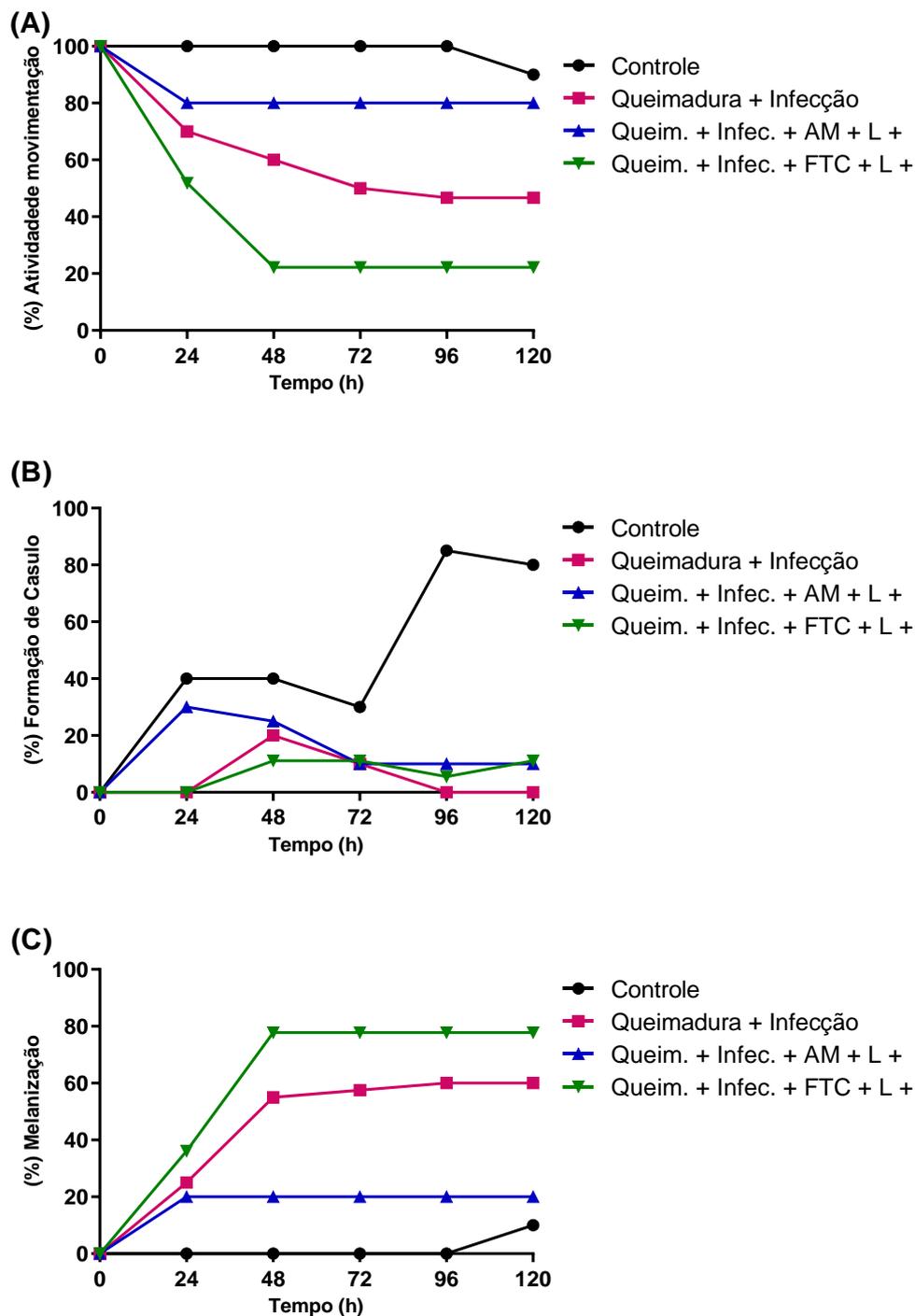
Com relação a atividade de movimentação das larvas de *G. mellonella* (Figura 29A), foi possível observar que no grupo Controle as larvas apresentaram 90% de atividade, já no grupo Queimadura + Infecção, essa atividade reduziu para 46,6% ( $p=0,0206$ ). O grupo tratado com TFDa medida por AM (Queim. + Infec. + AM+ L+) manteve 80% de atividade de movimentação, promovendo melhora desse atributo em relação ao grupo de larvas com infecção sem tratamento (Queimadura + Infecção) ( $p=0,2668$ ). Porém as larvas do grupo submetido a TFDa mediada por FTC (Queim. + Infec. + FTC + L+) apresentaram atividade de 22,2% ( $p=0,2321$ ).

O segundo atributo analisado foi a formação de casulo (Figura 29B). O grupo Controle apresentou índice de 80%, com diferença estatística significativa com relação ao grupo Queimadura + Infecção com 0% ( $p=0,0036$ ). As larvas submetidas a TFDa com AM (Queim. + Infec. + AM+ L+) e do grupo de TFDa mediado por FTC (Queim. + Infec. + FTC + L+) obtiveram 10%, sem diferença significativa em relação ao grupo com infecção sem tratamento ( $p=0,8055$ ) ( $p=0,9989$ ) respectivamente.

Por fim, foi analisada e comparada a melanização entre os grupos (Figura 29C). As larvas do grupo Queimadura + Infecção apresentaram índice de melanização de 60%, já no grupo Controle esse índice foi 10% ( $p=0,0145$ ). No grupo de TFDa com AM (Queim. + Infec. + AM+ L+), a melanização foi de 20%, apresentando melhora com relação ao grupo sem tratamento ( $p=0,1713$ ). Entretanto o grupo TFDa mediado por FTC (Queim. + Infec. + FTC + L+) apresentou 77,7%, ( $p=0,6183$ ).

Em síntese, observou-se que a presença de infecção nas larvas reduziu a atividade de movimentação e formação de casulo, bem como aumentou o índice de melanização, caracterizando o processo de infecção esperado. Com a aplicação da TFDa mediada por AM foi possível aumentar a movimentação e formação de casulo das larvas e promover a redução do processo de melanização.

Figura 29 – Pontuação média dos atributos do índice de saúde de larvas de *G. mellonella* com lesão de queimadura infectada por *A. baumannii*, submetida à TFDa



Legenda: a) Pontuação média das larvas em relação a atividade de movimentação; b) Pontuação média das larvas em relação a formação de casulo; c) Pontuação média das larvas em relação a melanização; (Queim. + Infec. + AM+ L+) Queimadura com infecção submetida ao AM com luz; (Queim. + Infec. + FTC+ L+) Queimadura com infecção submetida ao FTC com luz.

Fonte: Elaborada pelo autor.

## 5 DISCUSSÃO

Esse estudo propôs o uso do Farnesol como um adjuvante à TFDa. O Farnesol é um composto natural do *quorum sensing* de *C. albicans* que pode apresentar ação antifúngica e antibacteriana (Polke, Jacobsen, 2017). A capacidade dessa molécula de interferir na integridade da membrana de bactérias, como *A. baumannii* (Kostoulas et al., 2015), despertou o interesse no uso desse composto para aumentar a ação da TFDa sobre *A. baumannii*, principalmente em cepas resistentes aos antibióticos.

Com esse objetivo, foi investigada a capacidade do Farnesol em alterar a membrana celular e influenciar na absorção dos fotossensibilizadores pelas células bacterianas. Nesse ensaio, foi analisada a capacidade de absorção do AM e FTC pelas células de *A. baumannii*, previamente tratadas com Farnesol por 2 h. Como resultado, o grupo que interagiu com AM sem Farnesol apresentou valores de absorção do fotossensibilizador pelas células bacterianas superiores ao grupo com AM pré tratado com Farnesol. Já o grupo que interagiu com FTC sem tratamento prévio com Farnesol mostrou valores de absorção semelhantes ao grupo tratado com FTC e Farnesol. Esses resultados indicam que o Farnesol não aumentou a absorção de ambos os fotossensibilizadores testados. Esses dados confrontam o estudo de Kostoulas et al. (2015), no qual *A. baumannii* foi exposto ao Farnesol por 1 h, e após esse período a molécula afetou a expressão gênica da bactéria relacionada à integridade, estrutura e função da membrana bacteriana, interferindo na permeabilidade da membrana.

Posteriormente, o Farnesol foi testado no ensaio para contagem de UFC/mL em cultura planctônica de *A. baumannii* submetidas a TFDa. O Laser foi usado com potência de 50 mW, densidade de potência de 50 mW/cm<sup>2</sup>, densidade de energia de 15 J/cm<sup>2</sup> e tempo de exposição de 300 s. Foram realizados testes de TFDa mediada por AM e FTC associados ou não ao pré-tratamento com Farnesol, tanto em cepa ATCC como na cepa clínica A1. A TFDa realizada com AM, após o tratamento das cepas com Farnesol, reduziu o crescimento bacteriano da cepa ATCC e clínica A1 respectivamente em 3 e 2 log (UFC/mL). Sem o pré-tratamento com Farnesol essa redução foi maior, de 4 log para ATCC e 3 log para cepa A1. Nos grupos pré-tratados

com Farnesol e TFDa mediados por FTC, com ambas as cepas testadas, não houve redução bacteriana em relação aos grupos controles. Já sem o pré-tratamento com Farnesol a redução do crescimento bacteriano foi de 2 log.

Os resultados encontrados conflitam com o encontrado no estudo de Kossakowska-Zwierucho et al. (2020) desenvolvido com bactérias Gram-positivas. Esse estudo analisou o efeito da TFDa mediada pela porfirina catiônica - 5,10,15,20 - *tetrakis* (1-metil piridínio-4-il) tetratosilato de porfirina (TMPyP) e azul de toluidina O, ativados por luz Led vermelha sobre culturas de *Staphylococcus aureus* pré-tratadas com Farnesol. Foi utilizada a irradiação Led em vermelho visível (630 nm), densidade de potência de 23,4 mW/cm<sup>2</sup>, dose de energia de 10-30 J/cm<sup>2</sup>, com 7 min e 7 s para cada 10 J/cm<sup>2</sup> emitidos. A redução bacteriana pela TFDa associada ao azul de toluidina O foi de 3 log (UFC/ml), já a TFDa mediada pela TMPyP atingiu aproximadamente 5 log na dose de 20 J/cm<sup>2</sup>, que correspondeu a uma redução de 99,9% de crescimento bacteriano. Porém, esses resultados não puderam ser explicados por nenhuma das características analisadas, como propriedades espectrais, formação de espécies reativas de oxigênio, captação de fotossensibilizador, propriedades do fotossensibilizador e sua interação com o Farnesol.

O resultado da interação do Farnesol junto a TFDa sobre *S. aureus*, em contrapartida ao resultado com *A. baumannii*, pode ser devido ao seu papel na potencialização de agentes antibacterianos, especialmente para bactérias Gram-positivas (Brehm-Stecher, Johnson, 2003; Gomes et al., 2009).

Após os ensaios com a fonte de luz Laser, novos ensaios de TFDa foram realizados com o uso do dispositivo de Leds, com o mesmo comprimento de onda vermelho visível (660nm), porém com potência de 42,8 mW, densidade de potência de 42,8 mW/cm<sup>2</sup>, densidade de energia de 30 J/cm<sup>2</sup> e tempo de exposição de 700 s. É importante ressaltar que para o sucesso da irradiação de um fotossensibilizador, o espectro de emissão, o modo de entrega dessa luz e sua intensidade são mais importantes que o tipo da fonte de luz (Laser, Led ou lâmpada) (Cieplik et al., 2018).

A TFDa com dispositivo Led mediada por FTC, aplicada nas cepas padrão e clínicas de *A. baumannii*, promoveu redução de cerca de 2 log (UFC/mL), exceto a cepa A2 que não mostrou redução. Com o uso do AM na TFDa, a redução mínima de crescimento bacteriano foi de 6 log até a inibição total. Esses resultados mostram que

existe maior efeito antibacteriano do AM na TFDa sobre as células de *A. baumannii*. O AM já é um fotossensibilizador de uso convencional na TFDa, com benefícios já descritos na literatura.

Os resultados de Sabino et al. (2020) foram similares aos encontrados em nosso estudo. O efeito da TFDa mediada por AM a 100  $\mu\text{M}$  foi analisado sobre cepas multirresistentes Gram-positivas e Gram-negativas. Foi usada fonte de luz Led vermelho visível (660 nm), irradiância de 100  $\text{mW}/\text{cm}^2$  e tempo de pré-irradiação de 10 min. Em menos de 75 s de aplicação, com doses de energia superiores a 40  $\text{J}/\text{cm}^2$ , foram encontradas reduções maiores que 5 log nas cepas de *A. baumannii*, *E. coli*, *E. faecium*, *E. faecalis* e *S. aureus*. Para as cepas de *Klebsiella aerogenes*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans* a redução de UFC/mL ocorreu apenas no tempo de 7 min de irradiação.

Outro estudo com AM analisou o efeito da TFDa sobre isolados clínicos de *A. baumannii* susceptíveis e resistentes a carbapenêmicos, cujos resultados também foram concordantes com nossos achados. As cepas foram submetidas a TFDa mediada por azul de metileno (0,1 mg/mL), com irradiação Laser vermelho visível (660 nm), potência de saída de 0,035 W, fluência de 39,5  $\text{J}/\text{cm}^2$ , energia de 15 J e tempo de aplicação de 428 s. A TFDa reduziu o número de UFC/mL da cepa ATCC e das cepas sensíveis aos antibióticos, sendo essas reduções de 92% para cepa ATCC 19.606, 63% para cepa AS1, 70% para cepa AS5 e 88% para cepa AS2. Esses autores avaliaram também 18 cepas clínicas de *A. baumannii* resistentes aos antibióticos convencionais. Nessas cepas resistentes, a redução microbiana alcançada pela TFDa variou de 24 a 97%, sendo superior a 50% em 15 cepas e superior a 80% em 11 cepas (Mello et al., 2019).

A seguir, a TFDa com Led foi testada sobre o biofilme de *A. baumannii*, mediada pelo AM e FTC nas respectivas concentrações de 0,2 mg/mL e 1,2 mg/mL. O tempo de pré-irradiação foi de 30 min e a densidade de energia de 30  $\text{J}/\text{cm}^2$ . A TFDa com AM reduziu 4 log de crescimento bacteriano, enquanto que com FTC não houve nenhuma redução, mostrando que a ação antimicrobiana do AM como mediador da TFDa sobre o biofilme de *A. baumannii* foi maior que o FTC.

O FTC apresentou resultados divergentes no estudo de Garcia et al. (2018), no qual foram testados o AM (1 mg/mL) e dois fotossensibilizadores de segunda geração derivados da clorina, Photoditazine® (PDZ) (0,6 mg/mL) e Fotoenticine® (FTC) (0,6

mg/mL), sobre o biofilme de *Streptococcus mutans*. A TFDa obteve redução de 4 log com AM, 6 log com PDZ e completa eliminação com FTC, indicando que a TFDa mediada por fotossensibilizadores derivados da clorina apresentou maior ação antimicrobiana em biofilme de *S. mutans* do que com o uso de AM. Provavelmente, as diferenças desse estudo em *S. mutans* com os resultados do presente estudo em *A. baumannii* possam ser atribuídas a diferença da composição da parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

A membrana externa das bactérias Gram-negativas que confere resistência aos antimicrobianos, faz com que a entrada do fotossensibilizador seja limitada por barreiras da membrana, para chegar no citoplasma da célula. Essas barreiras impedem a captação de um fotossensibilizador aniônico e neutro. Fotossensibilizadores com carga positiva (catiônica), incluindo porfirinas e o AM conseguem inativar bactérias Gram-negativas com menor dificuldade (Cieplik et al., 2018).

Após os testes *in vitro*, foi analisada a resposta da infecção por *A. baumannii* frente a TFDa em modelo *in vivo*. A maior parte dos trabalhos existentes atualmente com modelos de queimadura são desenvolvidos em modelos murinos. Geralmente, esses ensaios usam muitos animais e ocorrem por tempo prolongado (Sperandio et al., 2013). Entretanto, as restrições éticas que buscam a redução do uso de animais vertebrados têm estimulado o crescimento do uso de modelos invertebrados nos estudos *in vivo*.

Nesse trabalho, estabelecemos um modelo de queimaduras em larvas de *G. mellonella* a fim de reproduzir a infecção por *A. baumannii* em queimaduras e analisar o efeito da TFDa. O modelo foi ajustado e estabelecido com base no protocolo de queimadura em invertebrados desenvolvido por Maslova et al. (2020). Após instituída a lesão de queimadura no dorso das larvas, foi estabelecida a infecção com a administração do inóculo na queimadura e após 30 min foi aplicado o fotossensibilizador de forma tópica, sendo então realizada a irradiação.

O efeito da TFDa sobre as lesões de queimadura infectadas por *A. baumannii* foi analisado pela curva de sobrevivência no período de 5 dias. O grupo com queimadura e infecção desencadeou a mortalidade de 55% das larvas. A aplicação da TFDa mediada por AM fez com que as larvas reduzissem a mortalidade para 20%, resultando na melhora da sobrevivência em 35%. Porém, a TFDa mediada por FTC não

promoveu melhora na sobrevivência. Esses dados indicaram que o uso do AM na TFDa proporcionou melhora da infecção por *A. baumannii* em lesão de queimadura no modelo de *G. mellonella*.

Não existem ainda trabalhos que utilizem modelos de queimaduras em invertebrados, mas no modelo murino alguns trabalhos podem ser discutidos. Os resultados obtidos em nosso estudo diferem dos encontrados por Dai et al. (2009). Esses autores desenvolveram um modelo de queimaduras térmicas em camundongos infectados com isolado clínico de *A. baumannii* bioluminescente. A aplicação do micro-organismo foi realizada na região da queimadura, localizada no dorso do camundongo, após 5 min da lesão de queimadura. A TFDa consistiu na aplicação tópica do fotossensibilizador, uma conjugação covalente de clorina (e6) à polietilenimina, 30 min, 24 h e 48 h após a infecção, seguida de iluminação com fonte de luz vermelha visível. A TFDa aplicada imediatamente após a infecção resultou na redução de 3 log de luminescência bacteriana e a aplicação no dia 1 ou 2 reduziu 1,7 log, sugerindo a efetividade da TFDa mediada por um conjugado da clorina no tratamento localizado da infecção por *A. baumannii* multirresistente.

Com relação aos modelos invertebrados, se tratando de um modelo novo no estudo de lesões de queimadura infectadas, é necessário que mais estudos sejam realizados a fim de ajustar um protocolo de TFDa com parâmetros de fluência, e concentração de fotossensibilizadores para obter maior eficácia antibacteriana da terapia fotodinâmica.

Para complementar a avaliação da sobrevivência das larvas, a análise de atributos adicionais de saúde, como atividade de movimentação, melanização e formação de casulo, têm sido utilizados como informações importantes para avaliar de forma mais detalhada a patogenicidade e virulência de micro-organismos em invertebrados (Romera et al., 2020). Os índices de movimentação e formação de casulo são atributos de uma larva saudável, enquanto o índice de melanização está relacionado a resposta imune das larvas frente à uma infecção.

No presente estudo, observou-se que a presença de infecção nas larvas reduziu a atividade de movimentação e formação de casulo bem como aumentou o índice de melanização, caracterizando um processo de infecção. De acordo com Wand et al. 2012, cepas mais virulentas de *A. baumannii* geram maiores índices de melanização em larvas de *G. mellonella*, em alguns casos, ocorrendo após 4 h de

infecção, sinalizando a morte da larva em até 24 h. Com relação à formação do casulo, sua redução pode corresponder um sinal de doença, já que naturalmente durante o desenvolvimento da larva até sua fase final há um decréscimo desse atributo (Jorjão et al., 2018). Com a aplicação da TFDa mediada por AM foi possível observar diferenças na pontuação dos atributos do índice de saúde. Houve acréscimo na movimentação e formação de casulo das larvas e redução no processo de melanização, indicando a melhora da saúde bem como da sobrevivência.

Desse modo, a TFDa utilizando uma nova clorina de segunda geração (FTC) foi bastante explorada nesse estudo, tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*. Nos ensaios *in vitro* foi possível concluir que o Farnesol não se mostrou um bom potencializador dos efeitos da TFDa com FTC ou AM. O fotossensibilizador FTC associado a TFDa, em culturas planctônicas, foi capaz de reduzir o crescimento bacteriano de *A. baumannii*, uma bactéria Gram-negativa. O AM como fotossensibilizador associado a TFDa apresentou maior efetividade antimicrobiana do que a TFDa com FTC, tanto em culturas planctônicas quanto em biofilmes. Nos ensaios *in vivo* em modelo de invertebrado, o AM associado a TFDa apresentou uma boa resposta no aumento da sobrevida larval, entretanto a TFDa com FTC não foi eficaz no tratamento das lesões infectadas por *A. baumannii*. Ainda são necessários mais estudos que testem diferentes dosimetrias de luz, concentrações de fotossensibilizadores e novos compostos a fim de elaborar um protocolo mais eficaz para potencializar a ação da TFDa no tratamento de bactérias Gram-negativas.

## 6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos concluiu-se que:

- a) O Farnesol, no teste de concentração inibitória mínima, não apresentou efeito antimicrobiano sobre *A. baumannii* em todas as concentrações testadas;
- b) Os fotossensibilizadores FTC e AM foram capazes de penetrar nas células de *A. baumannii*, sendo essa penetração mais evidente para o AM;  
- O Farnesol não foi capaz de alterar a membrana celular e aumentar a penetração dos fotossensibilizadores;
- c) A TFDa medida por FTC e AM apresentou atividade antimicrobiana sobre culturas planctônicas de *A. baumannii*, mas a ação do Farnesol na TFDa foi cepa dependente;
- d) A TFDa com AM levou a redução significativa de *A. baumannii* em biofilmes, já a TFDa com FTC não reduziu o número de UFC/mL embora tenha demonstrado danos na membrana das células bacterianas;
- e) A aplicação da TFDa com FTC não teve efeito sobre as lesões de queimaduras em *G. mellonella*, por outro lado a TFDa com AM aumentou a sobrevivência das larvas.

Portanto, considerando os parâmetros testados nesse estudo, a ação do Farnesol associada a TFDa foi cepa dependente. O FTC apresentou ação antimicrobiana na TFDa, mas não foi tão eficaz como o fotossensibilizador AM.

## REFERÊNCIAS\*

- Abdi SN, Ghotaslou R, Ganbarov K, Mobed A, Tanomand A, Yousefi M, et al. *Acinetobacter baumannii* efflux pumps and antibiotic resistance. *Infect Drug Resist*. 2020;13:423–34. doi: 10.2147/IDR.S228089.
- Atila A, Tomak L, Katrancı AO, Ceylan A, Kılıç SS. Mortality risk factors in burn care units considering the clinical significance of acinetobacter infections. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2015;21(1):34–8. PMID: 25779710.
- Bandara HMHN, Herpin MJ, Kolacny D, Harb A, Romanovicz D, Smyth HDC. Incorporation of farnesol significantly increases the efficacy of liposomal ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms *in vitro*. *Mol Pharm*. 2016;13(8):2760–70. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00360.
- Bayona AMDP, Mroz P, Thunshelle C, Hamblin MR. Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers. *Chem Biol Drug Des*. 2017;89(2):192–206. doi: 10.1111/cbdd.12792. PMID: 28205400.
- Brehm-Stecher BF, Johnson EA. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(10):3357–60. doi: 10.1128/AAC.47.10.3357-3360.2003. PMID: 14506058.
- Cao L, Zhang Z, Xu S, Ma M, Wei X. Farnesol inhibits development of caries by augmenting oxygen sensitivity and suppressing virulence-associated gene expression in *Streptococcus mutans*. *J Biomed Res*. 2017;31(March):333–43. doi: 10.7555/JBR.31.20150151.
- Casas A, Di Venosa G, Hasan T, Al Batlle. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. *Curr Med Chem*. 2011;18(16):2486–515. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted. PMID: 21568910.
- Chibebe Jr J, Sabino CP, Tan X, Junqueira JC, Wang Y, Fuchs BB, et al. Selective photoinactivation of *Candida albicans* in the non-vertebrate host infection model *Galleria mellonella*. *BMC Microbiol*. 2013;13(1):217. doi: 10.1186/1471-2180-13-217. PMID: 24083556.
- Cieplik F, Deng D, Crielaard W, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, et al. Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't. *Crit Rev Microbiol*. 2018;44(5):571–89. doi: 10.1080/1040841X.2018.1467876. PMID: 29749263.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—Ninth

---

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Edition. CLSI document M07-A9. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012. ISBN 1-56238-784-7.

Costa ACBP, Chibebe Junior J, Pereira CA, Machado AKDS, Beltrame Junior M, Junqueira JC, et al. Susceptibility of planktonic cultures of *Streptococcus mutans* to photodynamic therapy with a light-emitting diode. *Braz Oral Res.* 2010;24(4):413–8. doi: 10.1590/S1806-83242010000400007. PMID: 21180961.

Dai T, Huang Y-Y, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections – state of the art. *NIH Public Access.* 2010;6(617):170–88. doi: 10.1016/j.pdpdt.2009.10.008.Photodynamic. PMID: 19932449.

Dai T, Tegos GP, Lu Z, Huang L, Zhiyentayev T, Franklin MJ, et al. Photodynamic therapy for *Acinetobacter baumannii* burn infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(9):3929–34. doi: 10.1128/AAC.00027-09. PMID: 19564369.

Dovigo LN, Carmello JC, de Souza Costa CA, Vergani CE, Brunetti IL, Bagnato VS, et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Med Mycol.* 2013;51(3):243–51. doi: 10.3109/13693786.2012.714081. PMID: 22934533.

Eze EC, Chenia HY, El Zowalaty ME. *Acinetobacter baumannii* biofilms: Effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. *Infect Drug Resist.* 2018;11:2277–99. doi: 10.2147/IDR.S169894.

François A, Salvadori A, Bressenot A, Bezdetrnaya L, Guillemin F, D'Hallewin MA. How to avoid local side effects of bladder photodynamic therapy: impact of the fluence rate. *J Urol.* 2013;190(2):731–6. doi: 10.1016/j.juro.2013.01.046. PMID: 23353049.

Garcia M, Pereira AHC, Figueiredo-Godoi LMA, Jorge AOC, Strixino JF, Junqueira JC. Photodynamic therapy mediated by chlorin-type photosensitizers against *Streptococcus mutans* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018;24(August):256–61. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.08.012. PMID: 30157462.

George S, Kishen A. Photophysical, photochemical, and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection. *J Biomed Opt.* 2007;12(3):034029. doi: 10.1117/1.2745982. PMID: 17614737.

Gomes FIA, Teixeira P, Azeredo J, Oliveira R. Effect of farnesol on planktonic and biofilm cells of *Staphylococcus epidermidis*. *Curr Microbiol.* 2009;59(2):118–22. doi: 10.1007/s00284-009-9408-9. PMID: 19365686.

Gonzales FP, Maisch T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. *Fungal Biol.* 2012;116(1):1–10. doi: 10.1016/j.funbio.2011.10.001. PMID: 22208597.

- Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol*. 2016;33:67–73. doi: 10.1016/j.mib.2016.06.008. PMID: 27421070.
- Hsu L-Y, Apisarnthanarak A, Khan E, Suwantararat N, Ghafur A, Tambyahb PA. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and enterobacteriaceae in South and Southeast Asia. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(1):1–22. doi: 10.1128/CMR.00042-16.
- Jorjão AL, Oliveira LD, Scorzoni L, Figueiredo-Godoi LMA, Cristina A, Prata M, Jorge AOC, et al. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for *in vivo* microbiological studies. *Virulence*. 2018;9(1):383–9. doi: 10.1080/21505594.2017.1397871.
- Junqueira JC, Fuchs BB, Muhammed M, Coleman JJ, Suleiman JM, Vilela SF, et al. Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have similar *in vitro* biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. *BMC Microbiol*. 2011;11(1):247. doi: 10.1186/1471-2180-11-247. PMID: 22053894.
- Junqueira JC, Ribeiro MA, Rossoni RD, Barbosa JO, Querido SMR, Jorge AOC. Antimicrobial photodynamic therapy: photodynamic antimicrobial effects of malachite green on *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, and *Candida*. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(S1):S-67-S-72. doi: 10.1089/pho.2009.2526.
- Khademi H, Torabinia N, Allameh M, Jebreilamtigh HR. Comparative evaluation of photodynamic therapy induced by two different photosensitizers in rat experimental candidiasis. *Dent Res J (Isfahan)*. 2014;11(4):452–9. PMID: 25225558.
- Kharkwal GB, Sharma SK, Huang Y-Y, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for infections: Clinical applications. *Lasers Surg Med*. 2011;43(7):755–67. doi: 10.1002/lsm.21080. PMID: 22057503.
- Kong EF, Tsui C, Kucharíková S. Modulation of *Staphylococcus aureus* *Candida albicans* Quorum Sensing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(12):1–14. doi: 10.1128/AAC.01573-17. PMID: 28893777.
- Kossakowska-Zwierucho M, Szewczyk G, Sarna T, Nakonieczna J. Farnesol potentiates photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* with the use of red light-activated porphyrin TMPyP. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2020;206(December 2019):111863. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111863.
- Kostoulas X, Murray GL, Cerqueira GM, Kong JB, Bantun F, Mylonakis E, et al. Impact of a cross-kingdom signaling molecule of *Candida albicans* on *Acinetobacter baumannii* physiology. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(1):161–7. doi: 10.1128/AAC.01540-15. PMID: 26482299.
- Kou J, Dou D, Yang L. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget*. 2017;8(46):81591–603. doi: 10.18632/oncotarget.20189. PMID: 29113417.

- Li J, Qin M, Liu C, Ma W, Zeng X, Ji Y. Antimicrobial photodynamic therapy against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates mediated by aloe-emodin: An *in vitro* study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020;29:101632. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.101632. PMID: 31870894.
- Lin T-C, Wu R-X, Chiu C-C, Yang Y-S, Lee Y, Lin J-C, et al. The clinical and microbiological characteristics of infections in burn patients from the Formosa Fun Coast Dust Explosion. *J Microbiol Immunol Infect*. 2017. doi: 10.1016/j.jmii.2016.08.019. PMID: 28705768.
- Loh JM, Adenwalla N, Wiles S, Proft T. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence*. 2013;4(5):419–28. doi: 10.4161/viru.24930. PMID: 32430829.
- Maslova E, Shi Y, Sjöberg F, Azevedo HS, Wareham DW, McCarthy RR. An invertebrate burn wound model that recapitulates the hallmarks of burn trauma and infection seen in mammalian models. *Front Microbiol*. 2020;11(June):1–8. doi: 10.3389/fmicb.2020.00998.
- Mello MM de, Barros PP de, Bernardes R de C, Alves SR, Ramanzini NP, Figueiredo-Godoi LMA, et al. Antimicrobial photodynamic therapy against clinical isolates of carbapenem-susceptible and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Lasers Med Sci*. 2019. doi: 10.1007/s10103-019-02773-w.
- Mohd Rani F, A Rahman NI, Ismail S, Alattraqchi AG, Cleary DW, Clarke SC, et al. *Acinetobacter* spp. Infections in Malaysia: a review of antimicrobial resistance trends, mechanisms and epidemiology. *Front Microbiol*. 2017 Dec 12;8:2479. doi: 10.3389/fmicb.2017.02479. PMID: 29312188; PMCID: PMC5733036.
- Moubareck CA, Halat DH. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. *Antibiotics*. 2020;9(3):119. doi: 10.3390/antibiotics9030119.
- Nasr P. Genetics, epidemiology, and clinical manifestations of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Hosp Infect*. 2020;104(1):4–11. doi: 10.1016/j.jhin.2019.09.021.
- Nie D, Hu Y, Chen Z, Li M, Hou Z, Luo X, et al. Outer membrane protein A (OmpA) as a potential therapeutic target for *Acinetobacter baumannii* infection. *J Biomed Sci*. 2020;27(1):1–8. doi: 10.1186/s12929-020-0617-7.
- Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(11):4943–60. doi: 10.1128/AAC.00296-11. PMID: 21859938.
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(3):538–82. doi: 10.1128/CMR.00058-07. PMID: 18625687.

Pietruska M, Sobaniec S, Bernaczyk P, Cholewa M, Pietruski JK, Dolińska E, et al. Clinical evaluation of photodynamic therapy efficacy in the treatment of oral leukoplakia. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014;11(1):34–40. doi: 10.1016/j.pdpdt.2013.10.003. PMID: 24211597.

Polke M, Jacobsen ID. Quorum sensing by farnesol revisited. *Curr Genet*. 2017;63(5):791–7. doi: 10.1007/s00294-017-0683-x. PMID: 28247023.

Pourhajibagher M, Boluki E, Chiniforush N, Pourakbari B, Farshadzadeh Z, Ghorbanzadeh R, et al. Modulation of virulence in *Acinetobacter baumannii* cells surviving photodynamic treatment with toluidine blue. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016;15:202–12. doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.07.007. PMID: 27444886.

Ragàs X, Dai T, Tegos GP, Agut M, Nonell S, Hamblin MR. Photodynamic inactivation of *Acinetobacter baumannii* using phenothiazinium dyes: *In vitro* and *in vivo* studies. *Lasers Surg Med*. 2010;42(5):384–90. doi: 10.1002/lsm.20922.

Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis*. 2008;197(8):1079–81. doi: 10.1086/533452. PMID: 18419525.

Romera D, Aguilera-Correa J-J, García-Coca M, Mahillo-Fernández I, Viñuela-Sandoval L, García-Rodríguez J, et al. The *Galleria mellonella* infection model as a system to investigate the virulence of *Candida auris* strains. *Pathog Dis*. 2020;78(9):51–87. doi: 10.1093/femspd/ftaa067.

Sabino CP, Wainwright M, Ribeiro MS, Sellera FP, dos Anjos C, Baptista M da S, et al. Global priority multidrug-resistant pathogens do not resist photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2020;208:111893. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111893. PMID: 32446039.

Sahu A, Choi W II, Lee JH, Tae G. Graphene oxide mediated delivery of methylene blue for combined photodynamic and photothermal therapy. *Biomaterials*. 2013;34(26):6239–48. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.066.

Schastak S, Gitter B, Handzel R, Hermann R, Wiedemann P. Improved photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive methicillin-resistant bacterial strains using a new near-infrared absorbing meso-tetrahydroporphyrin: A comparative study with a chlorine e6 photosensitizer photolon. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2008;30(2):129. doi: 10.1358/mf.2008.30.2.1165448.

Silva RC da. Avaliação da eficiência fotodinâmica de fotossensibilizadores com aplicação em terapia fotodinâmica [dissertação]. São Carlos (SP): Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos; 2007.

Simplicio FI, Maionchi F, Hioka N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quim Nova*. 2002;25(5):801–7. doi: 10.1590/S0100-40422002000500016.

- Sperandio F, Huang Y-Y, Hamblin M. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2013;8(2):108–20. doi: 10.2174/1574891x113089990012. PMID: 23550545.
- St Denis TG, Dai T, Izikson L, Astrakas C, Anderson RR, Hamblin MR, et al. All you need is light. *Virulence.* 2011;2(6):509–20. doi: 10.4161/viru.2.6.17889. PMID: 21971183.
- St Denis TG, Hamblin MR. Synthesis, bioanalysis and biodistribution of photosensitizer conjugates for photodynamic therapy. *Bioanalysis.* 2013;5(9):1099–114. doi: 10.4155/bio.13.37. PMID: 23641699.
- Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol.* 2006;51(8):672–80. doi: 10.1016/j.archoralbio.2006.02.005. PMID: 16620775.
- Wand ME, Bock LJ, Turton JF, Nugent PG, Sutton JM. *Acinetobacter baumannii* virulence is enhanced in *Galleria mellonella* following biofilm adaptation. *J Med Microbiol.* 2012;61(4):470–7. doi: 10.1099/jmm.0.037523-0. PMID: 22194338.
- Wareth G, Brandt C, Sprague LD, Neubauer H, Pletz MW. Spatio-temporal distribution of *Acinetobacter baumannii* in Germany—a comprehensive systematic review of studies on resistance development in humans (2000–2018). *Microorganisms.* 2020;8(3):1–24. doi: 10.3390/microorganisms8030375.
- Yang H, Wang WS, Tan Y, Zhang DJ, Wu JJ, Lei X. Investigation and analysis of the characteristics and drug sensitivity of bacteria in skin ulcer infections. *Chin J Traumatol.* 2017 Aug;20(4):194-7. doi: 10.1016/j.cjtee.2016.09.005. Epub 2017 May 24. PMID: 28689800; PMCID: PMC5555241.
- Yuan Y, Liu Z-Q, Jin H, Sun S, Liu T-J, Wang X, et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy with the novel amino acid-porphyrin conjugate 4I: *In vitro* and *in vivo* studies. *PLoS One.* 2017;12(5):e0176529. doi: 10.1371/journal.pone.0176529.