

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

Sarah Raquel De Annunzio

**Atividade antimicrobiana sinérgica da terapia fotodinâmica e
tetraciclina contra *Propionibacterium acnes***

Processo CNPq nº 130182/2016-8

Araraquara - SP
2017

Sarah Raquel De Annunzio

**Atividade antimicrobiana sinérgica da terapia
fotodinâmica e tetraciclina contra *Propionibacterium*
*acnes***

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

Orientadora: Profa. Dra. Carla Raquel Fontana

Araraquara - SP
2017

Ficha Catalográfica

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

D281a De Annunzio, Sarah Raquel
Atividade antimicrobiana sinérgica da terapia fotodinâmica e tetraciclina contra
Propionibacterium acnes / Sarah Raquel De Annunzio. – Araraquara, 2017.
87 f. : il.

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

Orientador: Carla Raquel Fontana.

1. Terapia Fotodinâmica. 2. Acne vulgar. 3. *Propionibacterium acnes*. 4. Curcumina.
5. Tetraciclina. 6. Terapia combinada. I. Fontana, Carla Raquel, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Maria Irani Coito CRB-8/4.440

CAPES: 40500005

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Atividade antimicrobiana sinérgica da terapia fotodinâmica e tetraciclina contra *Propionibacterium acnes*

AUTORA: SARAH RAQUEL DE ANNUNZIO

ORIENTADORA: CARLA RAQUEL FONTANA MENDONÇA

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

A handwritten signature in blue ink, reading "Carla Fontana", is positioned above the name of the supervisor.

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

A handwritten signature in blue ink, reading "Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo", is positioned above the name of the second supervisor.

Profa. Dra. ILANA LOPES BARATELLA DA CUNHA CAMARGO
Departamento de Física e Ciências Interdisciplinares / UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

A handwritten signature in blue ink, reading "Juliana Cabrini Carmello", is positioned above the name of the third supervisor.

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

Araraquara, 18 de dezembro de 2017

*Dedico esse trabalho aos meus pais e ao meu irmão, pelo apoio e
incentivo em todos os momentos!*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças e serenidade em todos os momentos e por ter colocado em meu caminho tantas pessoas maravilhosas!

Aos meus pais, por sempre terem me incentivado e por muitas vezes abrirem mão dos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus! O apoio de vocês foi fundamental para que esse trabalho fosse realizado! NÓS conseguimos!

Ao meu irmão Renato, que sempre esteve presente para me apoiar, com seu jeito divertido, sempre me ajudando e animando nos momentos difíceis!

À minha tia Elza, por sempre torcer por mim, me apoiar e incentivar!

À minha orientadora Carla, por compartilhar comigo toda sua bagagem de conhecimentos, e não apenas por ser minha orientadora, mas também por ser minha amiga! O meu eterno carinho, respeito, gratidão e admiração por você, Carla! Não apenas por ser essa excelente profissional, mas por ser esse ser humano incrível! Sou muito grata por ter uma orientadora como você!

À técnica de laboratório Elaine, por todas as ajudas no laboratório, pela excelente convivência, pela amizade! Minha eterna gratidão e carinho por você!

Aos amigos do laboratório, Malu, Laura, Lucas e Laís! Com certeza a minha trajetória no mestrado foi mais alegre, divertida e leve com a presença de vocês! Sou muito grata por ter tido a oportunidade de trabalhar com pessoas tão especiais como vocês!

A todos os professores e funcionários da FCFAr, em especial as meninas da seção técnica de pós graduação: Cláudia, Daniela, Aniele e Chirstiane, por serem sempre tão gentis e solícitas!

Às meninas da república Colgatas: Gardenha, Larissa e Raquel, por terem sido minha família nesse período, pela convivência harmoniosa, por me ajudarem e incentivarem nos momentos difíceis e por tornarem meus dias mais leves, felizes e divertidos!

Aprendi muito com todas vocês! A minha eterna gratidão e carinho por vocês!

Ao Cnpq (número do processo: 130182/2016-8 , pelo apoio financeiro deste trabalho!

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.
(José de Alencar)

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

FIGURA 1.....	28
FIGURA 2	30
FIGURA 3	32
FIGURA 4.....	44
FIGURA 5	45
FIGURA 6	45
FIGURA 7.....	46
FIGURA 8	47
FIGURA 9	48
FIGURA 10	49
FIGURA 11	49
FIGURA 12	50
FIGURA 13	51
FIGURA 14	52
FIGURA 15	53
FIGURA 16	53
FIGURA 17	54
FIGURA 18	55
FIGURA 19	55
FIGURA 20	56
FIGURA 21	57
FIGURA 22	58
FIGURA 23	59
FIGURA 24	60
FIGURA 25	61
FIGURA 26	62
FIGURA 27	63
FIGURA 28	64
FIGURA 29	65
FIGURA 30	67
FIGURA 31	68
FIGURA 32	69
FIGURA 33	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.....	35
TABELA 2	39

LISTA DE ABREVIATURAS

+L	Presença de luz
5-ALA	Ácido 5-aminolevulínico
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CA	Califórnia
CBM	Concentração bactericida mínima
CN	Controle negativo
CV	Controle de veículo
COCs	Contraceptivos Orais Combinados
D.O.	Densidade ótica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FS	Fotossensibilizador
IPL	<i>Intensed Pulsed Light</i>
LED	<i>Light Emitting Diodes</i>
Log ₁₀	Logarítimo na base 10
LPS	Lipopolissacarídeo
MH	Caldo <i>Mueller Hinton</i>
Min.	Minutos
Ns	Não significativo
N	Número amostral
PBS	Salina tamponada com fosfato
<i>P. acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
RCA	<i>Reinforced Clostridial Agar</i>
Seg.	Segundos
TLRs	<i>Toll-like Receptors</i>
TSB	Caldo <i>Tryptic Soy Broth</i>

TETRA	Tetraciclina
UV-VIS	Ultravioleta-Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
cél/mL	Célula por mililitro
g/mol	Gramma por mol
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL-8	Interleucina 8
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
mL	Mililitro
mW/cm ²	Milliwatts por centímetro quadrado
nm	Nanômetros
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
μ g/mL	Micrograma por mililitro
μ L	Microlitros

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	12
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. <i>Propionibacterium acnes</i>	18
1.2. Biofilme bacteriano e a Acne vulgar	19
1.3. Tratamentos Convencionais para acne vulgar	20
1.4. Terapia Fotodinâmica.....	22
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos Específicos	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Materiais de Consumo e Instrumentais.....	26
3.2. Equipamentos.....	27
3.3. Método – Estudo I (Avaliação da TFDa mediada por curcumina dissolvida em caldo TSB e solução de sacarose 0,5% em fase planctônica e biofilme)	27
3.3.1. Reativação da Cepa.....	27
3.3.2. Curva de crescimento	28
3.3.3. Fotossensibilizador e fonte de Luz	29
3.3.4. Espectro de absorção da solução de Curcumina	30
3.3.5. Terapia Fotodinâmica.....	30
3.3.6. Avaliação da viabilidade celular em fase planctônica (UFC/mL)	31
3.3.7. Grupos avaliados em fase planctônica.....	33
3.3.8. Desenvolvimento do biofilme e avaliação da viabilidade celular (UFC/mL)	35
3.3.9.1. Inibição da formação do biofilme.....	37
3.3.9.2. Grupos avaliados em biofilme	37
-Grupo controle negativo (CN)	37
3.3.9.3. Análise estatística	39
3.4. Método – Estudo II (Avaliação da atividade sinérgica da TFDa e tetraciclina)	39
3.4.2. Terapia combinada em fase planctônica.....	40
3.4.3. TFDa seguida de antibiótico.....	40
3.4.4. Antibiótico seguido de TFDa	41
3.4.5. Terapia combinada em biofilme	42
3.4.6. Análise Estatística	44
4. RESULTADOS.....	44

4.1. ESTUDO I.....	44
4.1.2. Curva de crescimento	44
4.1.3. Espectros de absorção de luz.....	45
4.1.4. Terapia fotodinâmica mediada por curcumina dissolvida em caldo TSB em fase planctônica.....	47
4.1.5. Terapia fotodinâmica mediada por curcumina dissolvida em sacarose 0,5% em fase planctônica.....	52
4.1.6. Terapia fotodinâmica mediada por Curcumina dissolvida em TSB em biofilme	55
4.1.7. Terapia fotodinâmica mediada por Curcumina dissolvida em sacarose 0,5% em biofilme	59
4.1.8. Avaliação da biomassa total do biofilme – curcumina dissolvida em caldo TSB	61
4.1.9. Avaliação da biomassa total do biofilme – curcumina dissolvida em sacarose 0,5%	62
4.1.9.1. Inibição da formação do biofilme – curcumina dissolvida em caldo TSB.....	63
4.1.9.2. Inibição da formação do biofilme – curcumina dissolvida em sacarose 0,5%	64
4. 2. ESTUDO II.....	64
4.2.1. Concentração bactericida mínima (CBM).....	64
4.2.2. Avaliação da terapia combinada em suspensão.....	66
4.2.3. Avaliação da terapia combinada em biofilme	67
4.2.3. Avaliação da biomassa total - terapia combinada	68
4.2.4. Avaliação da inibição da formação do biofilme – terapia combinada	69
5. Discussão	70
6. Conclusões.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
CAPÍTULO II: Susceptibility of <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Propionibacterium acnes</i> to antimicrobial photodynamic therapy	87

CAPÍTULO I

RESUMO

A Acne vulgar é uma das mais comuns doenças dermatológicas atingindo adolescentes e adultos. A principal causadora da acne é a infecção pela bactéria *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*). Atualmente, as opções de tratamento para acne vulgar são numerosas, porém muitas vezes com extensos efeitos colaterais. Fatores como resistência aos antibióticos, e a ação inicial lenta das terapias tópicas têm levado pesquisadores a buscar tratamentos alternativos. Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar a eficácia da inativação fotodinâmica mediada por curcumina dissolvida em caldo (*TrypticSoyBroth*) TSB e solução de sacarose 0,5% e a combinação dessa terapia com a tetraciclina, contra *P. acnes* em fase planctônica e biofilme. A viabilidade celular foi avaliada através da quantificação das colônias formadas por mililitro de amostra (UFC/mL). A concentração bactericida mínima (CBM) da tetraciclina sobre *P. acnes* foi determinada através do método de microdiluição em caldo. Foi realizada a avaliação da biomassa total e inibição da formação do biofilme através do método de coloração por cristal violeta 0,5%. A análise estatística dos dados foi feita através do teste de Análise de Variância (oneway ANOVA) com pós-teste de Tukey. Os resultados do presente estudo mostraram que a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) mediada por curcumina foi eficiente na redução microbiana quando realizada a quantificação das colônias formadas, comparada ao grupo controle negativo em forma planctônica bem como em biofilme tanto diluída em caldo TSB quanto em solução de sacarose 0,5% sendo capaz de reduzir toda a carga bacteriana. Uma redução de mais de 28% da biomassa total do biofilme e uma inibição de mais de 70% foi alcançada após o tratamento. Foi possível concluir que aTFDa mediada por curcumina dissolvida em caldo TSB e solução de sacarose 0,5% foi eficiente para a redução total da carga microbiana em fase planctônica e biofilme. A curcumina dissolvida em solução de sacarose 0,5% possibilitou essa redução utilizando menores concentrações e doses de luz. A terapia combinada não apresentou efeito sinérgico.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica. Acne vulgar. *Propionibacterium acnes*. Curcumina. Tetraciclina. Terapia combinada.

ABSTRACT

Acne vulgaris is one of the most common dermatological and adult diseases. The main cause of acne is an infection by the bacterium *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*). Currently there are many treatment options for acne vulgaris, although often with extensive side effects. Factors such as antibiotic resistance and slow initial action of topical therapies led researchers to seek alternative treatments. Thus, the present study aimed to evaluate the efficacy of curcumin-mediated photodynamic inactivation in broth (*Tryptic Soy Broth*) TSB and 0.5% sucrose solution and the combination of this therapy with tetracycline against planktonic phase *P. acnes* and biofilm. Cell viability was evaluated by quantification of the colonies formed per milliliter of sample (CFU / mL). The minimum bactericidal concentration (MBC) of tetracycline over *P. acnes* was determined by the broth microdilution method. The evaluation of the total biomass and inhibition of the formation of the biofilm was performed through the method of staining by violet crystal 0.5%. The statistical analysis of the data was done through the variance analysis (ANOVA one way) test with Tukey's post test. The results of this study showed that curcumin-mediated photodynamic antimicrobial therapy (TFDa) was efficient in microbial reduction when quantification of the colonies was performed, compared to the negative control group in planktonic form as well as in biofilm both diluted in TSB broth and in solution sucrose 0.5% being able to reduce all bacterial load. A reduction of more than 28% of the total biofilm biomass and an inhibition of more than 70% was achieved after treatment. It was possible to conclude that curcumin-mediated TFDa dissolved in TSB broth and 0.5% sucrose solution was efficient for the total reduction of the planktonic and biofilm microbial load. Curcumin dissolved in 0.5% sucrose solution allowed this reduction using lower concentrations and doses of light. Combination therapy had no synergistic effect.

Keywords: Antimicrobial photodynamic therapy. Acne vulgaris. *Propionibacterium acnes*. Curcumin. Tetracycline. Combination therapy.

1. INTRODUÇÃO

A acne vulgar é uma das doenças de pele mais frequentes em dermatologia. Pode ser definida como uma doença inflamatória crônica do folículo pilossebáceo caracterizando-se inicialmente pela presença de comedões. Isso ocorre em função da obstrução do orifício de saída do folículo com o acúmulo de secreções, restos celulares e por micro-organismos, sendo *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) a principal bactéria relacionada à etiologia da acne vulgar (BRENNER *et al.*, 2006; RIBAS; OLIVEIRA, 2008; DESSINIOTI; KATSAMBAS, 2010).

Essa dermatose ocorre com maior frequência em jovens e adolescentes e pode evoluir até a idade adulta. Embora não apresente risco de vida, causa temor entre os adolescentes (FALCOCCHIO *et al.*, 2006; DA SILVA *et al.*, 2014). Diversos problemas têm sido relatados na literatura associados à acne, como por exemplo, um impacto negativo na autoestima dos pacientes, depressão e tendências suicidas (HALVORSEN *et al.*, 2011).

Fatores de riscos diversos têm sido associados ao surgimento da acne vulgar, dentre eles, a predisposição genética, o aumento nos níveis de hormônios androgênicos e da resistência à insulina podem apresentar relação com a presença de acne em mulheres que apresentam a Síndrome do Ovário Policístico, dieta rica em alimentos com alta carga glicêmica e gordurosos, o estresse emocional, uso de cosméticos oclusivos, tabagismo, sendo este último relacionado com a formação da acne em adultos (DI LANDRO *et al.*, 2012.; ALBUQUERQUE *et al.*, 2014; AYDEMIR, 2014; YANG *et al.*, 2014; LAMBERT, 2015; CHEN *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2015). Além dos fatores mencionados acima, alguns fármacos utilizados para o tratamento de depressão, epilepsia, tuberculose, o uso de anabolizantes esteroides também têm sido associados à acne vulgar (DESSINIOTI *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2014).

A formação da acne envolve quatro processos principais: o aumento da produção de sebo pelas glândulas sebáceas, a hiperqueratinização folicular ou hiperproliferação folicular ocasionando a obstrução dos folículos e levando a formação de microcomedões, sendo estes precursores de comedões, pápulas e pústulas; a colonização bacteriana dos folículos pilossebáceos por *P. acnes* e

a inflamação em torno da glândula sebácea por meio da liberação de mediadores inflamatórios (THIBOUTOT *et al.*, 2009; WILLIAMS *et al.*, 2012).

Atualmente, há uma variedade de terapias de sucesso que são usadas regularmente para o tratamento de acne vulgar. No entanto, o tratamento médico continua sendo o padrão ouro, incluindo medicamentos tópicos e sistêmicos, que são eficientes no tratamento da acne vulgar. Porém, algumas desvantagens associadas a estes tratamentos, dentre elas, a ação inicial lenta, extensos efeitos colaterais e a resistência bacteriana frente aos antibióticos (DESSINIOTI; KATSAMBAS, 2016), têm levado à procura de novas alternativas terapêuticas (COATES *et al.*, 2002; GOLD, 2007). Além disso, esses tratamentos muitas vezes requerem uso diário e podem levar a uma má adesão dos pacientes (BOEN *et al.*, 2017).

O tratamento com a luz, denominado fototerapia e o tratamento com a luz associado a uma substância fotossensível (Terapia Fotodinâmica antimicrobiana - TFDa) vêm sendo recentemente utilizados no combate as bactérias causadoras da acne visando diminuir os efeitos colaterais e melhorar a eficiência das terapias contra à acne (WAN; LIN, 2014; BOEN *et al.*, 2017).

Estudos recentes têm demonstrado que protocolos *in vitro* combinando tratamentos com ação antimicrobiana apresentam uma maior eficiência em comparação a protocolos que envolvem a monoterapia. A terapia combinada apresenta importantes benefícios, tais como, a redução do desenvolvimento da resistência aos fármacos, uma vez que um patógeno é menos susceptível a desenvolver resistência a múltiplos tratamentos simultaneamente, além de ser possível a utilização de menores concentrações das drogas combinadas, podendo minimizar os efeitos colaterais e a toxicidade (RONQUI *et al.*, 2016; KASHEF *et al.*, 2017).

1.1. *Propionibacterium acnes*

Propionibacterium acnes (*P. acnes*) faz parte da microbiota normal da pele, é um micro-organismo Gram-positivo, anaeróbio facultativo. Essa bactéria habita a unidade pilossebácea e é considerado um patógeno oportunista, pois sua proliferação aumenta quando existe uma maior produção de sebo na unidade pilossebácea (DESSINIOTI; KATSAMBAS, 2010).

O crescimento de *P. acnes* é favorecido com a formação dos comedões, propiciando um ambiente anaeróbio e rico em lipídios. *P. acnes* apresenta a capacidade de estimular a inflamação e a resposta imune. Esse micro-organismo consegue causar o rompimento da parede folicular por meio da liberação de enzimas, tais como proteases, hialuronidases e lipases (QUINTERO *et al.*, 2015). Outra característica importante é a liberação de fatores quimiotáticos para o recrutamento de linfócitos, macrófagos e neutrófilos. Essa bactéria age também sobre a imunidade inata, estimulando a ativação de receptores do tipo Toll, ou toll-like (TLRs) em queratinócitos, macrófagos e linfócitos T e B, e, assim, desencadeando uma cascata inflamatória com a produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucinas (IL-1 α L-8, IL-6, IL-12 e IL-17), e metaloproteinases, que degradam a matriz celular. (WILLIAMS *et al.*, 2012; BEYLOT *et al.*, 2014; GOLLNICK, 2015).

Além da bactéria *P. acnes*, outros micro-organismos também estão relacionados com a acne vulgar, sendo eles: *Propionibacterium avidum*, *Propionibacterium granulosum*, *Staphylococcus epidermidis* e *Malassezia furfur*, ambos são micro-organismos pertencentes à microbiota normal do folículo sebáceo, no entanto também podem apresentar relação com a acne vulgar, embora ainda seja inconclusiva a relevância desses micro-organismos na patogênese dessa doença (RIBEIRO *et al.*, 2015; FOX *et al.*, 2016).

1.2. Biofilme bacteriano e a Acne vulgar

Um biofilme microbiano é uma comunidade estruturada de células bacterianas que se encontram fechadas em uma matriz polimérica auto-produzida (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002). A matriz contém polissacarídeos, proteínas e DNA microbiano extracelular. Essa matriz protege das adversidades ambientais, como o sistema imunológico do hospedeiro. Infecções bacterianas crônicas diversas envolvem o biofilme, tornando tais infecções muito mais difíceis de serem erradicadas pela terapia convencional antibiótica (TARASZKIEWICZ *et al.*, 2013).

P. acnes pode ser encontrado nos folículos em forma de biofilme (JAHNS *et al.*, 2012). Em um estudo *in vitro* foi observado que as células sésseis de *P. acnes* são mais resistentes a agentes antimicrobianos do que

células planctônicas e revelaram que a formação do biofilme pode contribuir para o aumento da expressão de genes de virulência contribuindo para a patogênese da acne (COENYE *et al.*, 2007).

O biofilme envolvendo *P. acnes* foi identificado como um polímero de glicocálix, que age como uma cola biológica. Quando presente no sebo esse polímero leva a adesão dos queratinócitos, contribuindo dessa forma, com a formação dos comedões (BURKHART; BURKHART, 2007).

1.3. Tratamentos Convencionais para acne vulgar

Os tratamentos com antibióticos são os mais utilizados na terapêutica clínica dermatológica. As tetraciclinas (tetraciclina, doxiciclina, minociclina) são as mais prescritas para a acne, visto que apresentam propriedades anti-inflamatórias e antibacterianas (AYDEMIR, 2014; TAN, 2016; NAGLER *et al.*, 2016). As tetraciclinas são antibióticos de amplo espectro, apresentando grande eficiência frente a diversas bactérias, podendo ser tanto aeróbios quanto anaeróbios Gram-positivos e Gram-negativos (PATRICK, 2005). O mecanismo de ação dessa classe de antibióticos se dá através da inibição da síntese de proteínas por meio da ligação com a subunidade 30S dos ribossomos, impedindo a ligação do aminoacil-tRNA, dessa forma, a adição de novos aminoácidos para o aumento da cadeia proteica é bloqueada (VON NUSSBAUM *et al.*, 2006).

Uma opção de tratamento que apresenta grande efetividade contra *P.acnes* é a utilização do peróxido de benzoíla. Que atua liberando radicais livres de oxigênio oxidando as proteínas bacterianas (ZAENGLEIN *et al.*, 2016). Essa opção de tratamento é indicada para os casos de acne leve a moderada (PARTH *et al.*, 2016). No entanto, pode causar irritação no local de aplicação (WILLIAMS *et al.*, 2012; DRÉNO *et al.*, 2013).

A isotretinoína oral é um fármaco derivado da vitamina A, e age impedindo que ocorra a formação do sebo. Esse tratamento apresenta eficiência para acne sendo amplamente indicado para um tipo muito grave de acne, denominada acne cística (LEYDEN *et al.*, 2014). No entanto, devido ao fato da isotretinoína inibir a formação do sebo de todas as glândulas sebáceas presentes no corpo, diversos efeitos colaterais são relatados. (PELCZAR, 1997; MELNIK *et al.*, 2011; TAN *et al.*, 2016). A administração de retinóicos

tópicos também é amplamente utilizada, porém, não deve ser realizada de forma contínua tendo em vista que o seu uso no período de tempo de dois a três meses pode causar irritação, eritema, queimação e secura da pele (SMITH *et al.*, 2011).

Outra opção de tratamento disponível são os “peelings” químicos, que consistem da aplicação de ácidos, como ácidos glicólicos, salicílicos e os “peelings” mecânicos sendo estes, mais utilizados nos casos de acne grau I e II, além de serem utilizados também para tratar as cicatrizes deixadas pela acne (KEMPIAK E UEBELHOER, 2008, WANG *et al.*, 2010).

Os tratamentos cosméticos também são considerados uma opção de tratamento. Essa abordagem consiste na utilização de cosméticos que atuam em todas as causas que levam a formação da acne, apresentando funções como, limpeza, esfoliação, antissépticos, ação queratolítica, cicatrizante, hidratante, esfoliante, clareamento, sebonormalizante, ação anti-inflamatória, ação adstringente, bactericida e bacteriostática (GOODMAN, 2000, LANQUE, 2015).

O tratamento da acne em mulheres diagnosticadas com a Síndrome do Ovário Policístico consiste frequentemente de contraceptivos orais combinados (COCs). Esses contraceptivos possuem um estrógeno e uma progestina, sendo o estrógeno responsável pela supressão da atividade da glândula sebácea e redução da produção de andrógenos ovarianos e adrenais (WELL, 2013; ZAENGLEIN *et al.*, 2016). Esses medicamentos aumentam o risco de doenças cardiovasculares e câncer, além disso, podem causar efeitos adversos como, a cefaléia, náuseas, distensão abdominal, aumento de peso, alterações hepáticas, entre outros. Dessa forma, há contra indicação do uso desses contraceptivos em casos de gravidez, casos de tromboembolismo, doenças cardíacas ou hepáticas (BETTOLI *et al.*, 2015; HARPER, 2016).

Terapias baseadas em luz, como a luz intensa pulsada (IPL), fototerapia e TFDa estão sendo amplamente empregadas no tratamento da acne vulgar pois podem controlar a inflamação e reduzir as cicatrizes formadas (PEI *et al.*, 2015).

A IPL é uma modalidade de tratamento que emprega luz policromática. A hipótese em torno deste tratamento é que a IPL promove a fototermólise, ocorrendo absorção de luz por cromóforos endógenos na pele gerando calor e

energia suficiente para atingir os vasos sanguíneos que suprem as glândulas sebáceas reduzindo a produção de sebo. Porém, a IPL causa dor, inchaço, eritema, formação de vesículas e crostas, pois o dano térmico não é específico (PEI *et al.*, 2015; BARAKAT *et al.*, 2016).

A luz azul possui atividade antimicrobiana dispensando a utilização de um agente fotossensibilizante exógeno, pois apresenta a capacidade de excitar as porfirinas endógenas, levando à produção de espécies reativas do oxigênio e causando a microbiana. Além disso, a fototerapia possui efeito sobre as células epiteliais que formam as glândulas sebáceas promovendo a diminuição da produção de sebo e consequentemente à redução da inflamação (DAI *et al.*, 2012; YIN *et al.*, 2013; BROWNELL *et al.*, 2016).

A TFDa mediada pelo ácido 5 - aminolevulínico (5-ALA) como agente fotossensível vem sendo empregada como tratamento em dermatologia para o controle da acne vulgar em pacientes resistentes ou que são intolerantes às terapias convencionais e tem apresentado efetividade na erradicação de *P. acnes* (MA *et al.*, 2013; DONG *et al.*, 2016; FOX *et al.*, 2016).

1.4. Terapia Fotodinâmica

Durante a década de 90 foi descrito pela primeira vez o princípio da fotodinâmica. Esse feito foi realizado na Alemanha, por um estudante de medicina aluno do professor Herman Von Tappeiner, chamado Oscar Raab que observou a morte de um protozoário (paramécio) após ter sido exposto à luz na presença do corante acridina. Feita essa observação, os pesquisadores passaram a questionar se existia influencia da luz nos resultados. Mais tarde, com a continuação das pesquisas confirmou-se que a acridina e a luz aumentavam a toxicidade do protozoário (JUARRANZ *et al.*, 2008). Estudos realizados posteriormente pelo professor Herman Von Tappeiner permitiram cunhar o termo “ação fotodinâmica” para descrever uma reação dependente de oxigênio após fotossensibilização (RKEIN e OZOG, 2014).

Três componentes fundamentais são necessários para a realização da TFD: oxigênio, fotossensibilizador (FS) e luz visível (DENIS *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2015; HAMBLIN, 2016).

FS é uma substância que leva a sensibilidade luminosa a processos físicos e/ ou químicos que normalmente não são sensíveis a luz (SIBATA *et al.*,

2000). Um agente FS deve apresentar algumas características específicas, dentre elas: ser biologicamente estável; quimicamente puro de composição conhecida; apresentar toxicidade mínima no escuro; preferencialmente ser retido pelo tecido alvo, ser excretado rapidamente pelo corpo para que não ocorra toxicidade sistêmica, possuir facilidade para absorver ou emitir fótons, custo baixo e ser facilmente sintetizado, boa seletividade, estabilidade cinética e termodinâmica (MACHADO, 2000; ALLISON *et al.*, 2004; NAGATA *et al.*, 2012).

Um exemplo de agente fotossensibilizador é a curcumina 1,7-bis-(hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, um dos três pigmentos curcuminóides encontrados na cúrcuma. É um composto fenólico, apresenta coloração amarelo-alaranjado, pode ser obtido através da extração dos rizomas da planta *Curcuma longa*, popularmente conhecida como “açafrão da terra” ou sintetizado quimicamente. Esse pigmento apresenta inúmeros efeitos antimicrobianos, antiinflamatórios, imunomoduladores, antioxidante (MIQUEL *et al.*, 2002; BRUZELL *et al.*, 2005; ALMEIDA, 2006).

Além das atividades mencionadas a cima, a curcumina vêm sendo amplamente utilizada em TFDa como agente fotossensibilizador (HAUKVIK, 2009; DOVIGO *et al.*, 2011, TONON *et al.*, 2005; NAJAFI *et al.*, 2016). Devido ao fato dessa molécula ser comprovadamente não tóxica através de diversos estudos realizados em cultura celular e em animais, a curcumina torna-se um fotossensibilizador promissor, tanto empregado contra infecções bacterianas quanto fúngicas (HAUKVIK *et al.*, 2011). A curcumina possui um espectro de absorção de luz de 300-500nm, apresentando um pico em 430nm (CIEPLIK *et al.*, 2014), sendo assim, sua utilização é bastante associada com a aplicação da luz azul.

O mecanismo de ação da morte microbiana da TFDa ocorre quando o FS absorve energia, gerando a produção de substâncias altamente reativas, que acarretam danos aos micro-organismos ou à célula-alvo. Este FS que foi excitado por luz de comprimento de onda específico pode interagir de duas formas, denominadas de reações tipo I e II.

Durante a reação tipo I, o FS no estado tripleto excitado reage com biomoléculas como, por exemplo, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos transferindo cargas para dar origem a radicais e íons radicais que então

reagem com o oxigênio molecular resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) como por exemplo, o ânion superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio. Durante a reação tipo II, o FS tripleto excitado transfere energia diretamente ao oxigênio em seu estado tripleto fundamental, em um fenômeno denominado aniquilação tripleto-tripletto, produzindo oxigênio singlete, altamente reativo e citotóxico. As duas reações ocorrem ao mesmo tempo e a relação entre esses dois processos depende da molécula fotossensível aplicada, das concentrações de substrato e oxigênio e também da afinidade de ligação do FS com o substrato (DOLMANS *et al.*, 2003; KHARKWAL *et al.*, 2011; HAMBLIN, 2016).

Uma das vantagens relacionadas à TFDa, é que até o momento não há relatos de desenvolvimento de resistência microbiana a essa modalidade de tratamento. Os fotossensibilizadores utilizados em TFDa agem através da produção de oxigênio singlete, sendo assim, não existe resistência microbiana natural. Além do mais, a morte microbiana pode ocorrer em um tempo curto o que torna pouco provável o desenvolvimento de resistência dos alvos das bactérias (HAMBLIN; HASAN, 2004).

Fontes de luz diversas podem ser utilizadas em terapia fotodinâmica como, por exemplo, as lâmpadas fluorescentes, que apresentam amplo espectro, os lasers e LEDs. As lâmpadas de amplo espectro foram as primeiras fontes de luz utilizadas devido ao fato de apresentarem baixo custo emitirem luz com diversos comprimentos de onda. Já os lasers emitem luz monocromática, com um comprimento de onda específico podendo apresentar compatibilidade com o pico de absorção do fotossensibilizador utilizado. O uso dessa fonte de luz proporciona danos menores ao tecido adjacente e ação em um pequeno tempo. Além de que, podem transmitir luz através de fibras ópticas que promovem o direcionamento da iluminação. No entanto, os lasers apresentam custo elevado, e apenas iluminam pequenas áreas da pele (CARNEIRO; CATÃO, 2012; NAGATA *et al.*, 2012).

As fontes de luz LED são aparelhos constituídos por semicondutores sólidos ligados entre si produzindo luz, que têm sido utilizados amplamente na TFD, pois são simples e de fácil manuseio, baixo custo, geram luz monocromática de alta potência em estreitas faixas espectrais com comprimentos de onda correspondentes ao pico de absorção do FS, não

ocasionando aquecimento intenso. Além das vantagens mencionadas anteriormente, podem ser distribuídos em painéis para iluminar uma área maior, aumentando a eficiência em TFDa (TOREZAN *et al.*, 2009; AMARAL *et al.*, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar *in vitro* o efeito da terapia fotodinâmica mediada por curcumina dissolvida em caldo TSB e solução de sacarose 0,5% irradiado por um sistema LED emissor de luz azul (450nm) como monoterapia e associado com a tetraciclina sobre o micro-organismo *P. acnes* em fase planctônica e biofilme.

2.2. Objetivos Específicos

- Padronizar curva de crescimento do *P. acnes*;
- Determinar o efeito tóxico da tetraciclina sobre o crescimento de *P. acnes*;
- Determinar o efeito tóxico do fotossensibilizador sobre o crescimento de *P. acnes*;
- Avaliar o efeito tóxico da luz (LED azul) sobre a bactéria;
- Definir os melhores parâmetros de irradiação (dose de luz e concentração do FS);
- Avaliar a viabilidade celular por contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC / mL) após terapia fotodinâmica e terapia combinada;
- Avaliar a biomassa total e a inibição da formação do biofilme de *P. acnes* através da coloração por cristal violeta 0,5% após monoterapia e terapia combinada;
- Avaliar se a ordem do tratamento afeta os resultados obtidos;

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados os seguintes materiais de consumo, instrumentais e equipamentos para a realização da fase experimental deste estudo:

3.1. Materiais de Consumo e Instrumentais

- Ácido Acético (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Água destilada
- Água Mili-Q
- Alça de inoculação 1 µL (Copan Diagnostics Inc., CA, EUA)
- Alça de inoculação 10 µL (Labor plast, Cassinettad iLugagnano, MI, Itália)
- Béquer graduado (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil)
- Cepa padrão de *P. acnes* (ATCC 6919) (Fiocruz, Manguinhos, RJ, Brasil)
- Cloreto de Cálcio (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Cloreto de Potássio (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Cloreto de Sódio (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Cristal Violeta (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Dimetilsulfóxido (DMSO), pureza $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Fosfato de Potássio (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Hemina (Sigma Chemical Co. St Louis, MD)
- Meio de cultura caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB - Acumedia, Lansing, Michigan)
- Meio de sólido *Reinforced Clostridial Agar* (RCA - Himedia, Mumbai, Índia)
- Meio de cultura caldo *Muller Hinton* (MH - Difco, Detroit, EUA)
- Meio de cultura sólido *Mueller Hinton* (Difco, Detroit, EUA)
- Metanol (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Micropipeta de 0,5 - 10 µL (Kasvi - Curitiba, PR, Brasil)
- Micropipeta de 20 - 200 µL (Kasvi - Curitiba, PR, Brasil)

- Micropipeta de 100 - 1000 μ L (Kasvi - Curitiba, PR, Brasil)
- Placa com 96 poços de fundo plano estéril, embaladas individualmente, (Kasvi - Curitiba, PR, Brasil)
- Placas de Petri 90 X 15 mm descartáveis, estéreis (Pleion, Barueri, SP, Brasil)
- Ponteiras para micropipetas nos volumes: 5 - 20 μ L; 20 - 200 μ L, 100 - 1000 μ L (Kasvi - Curitiba, PR, Brasil)
- Tetraciclina, pureza $\geq$ 98,0% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)

3.2. Equipamentos

- Agitador Vórtex (Kasvi - Curitiba, PR, Brasil)
- Aparelho de luz LED, 450 nm (IrradLED® – biopdi, São Carlos, SP, Brasil)
- Autoclave vertical (Phoenix Ind. e Com. De Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brasil)
- Balança de precisão Modelo: AG 200 (Gehaka – São Paulo, SP, Brasil)
- Centrífuga Micro (Fanem, São Paulo, SP, Brasil)
- Espectrofotômetro (Biotek, Winooski, VT, USA)
- Estufa bacteriológica Modelo (Quimis, Diadema, São Paulo, SP - Brasil)
- Jarra de anaerobiose (Permutation, Curitiba, PR, Brasil)
- Synergy H1M (Synergy H1 Multi-Mode Reader, Biotek, Winooski, VT, USA)

3.3. Método – Estudo I (Avaliação da TFDa mediada por curcumina dissolvida em caldo TSB e solução de sacarose 0,5% em fase planctônica e biofilme)

3.3.1. Reativação da Cepa

A cepa padrão de *P. acnes* (ATCC 6919) foi inoculada com auxílio de uma alça estéril em um tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo TSB, enriquecido com hemina e incubado a 37°C em jarra de anaerobiose até atingir a turvação indicando viabilidade microbiana. Após esse procedimento, uma

alíquota de 30 μL foi semeada em meio sólido RCA suplementado com hemina através do método de esgotamento (figura 1).

Figura 1: Cultura de *P. acnes* semeada em meio sólido RCA enriquecido.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.2. Curva de crescimento

Para realizar a curva de crescimento um volume de 2 mL da suspensão celular de *P. acnes* a uma $\text{D.O.}_{630\text{nm}}$ entre 0,01 e 0,02 foi preparada. A partir dessa suspensão foi retirada uma alíquota de 100 μL e a mesma foi acondicionada em caixa térmica com gelo. Posteriormente, outra alíquota de 100 μL da mesma suspensão foi adicionada a 12 poços de uma placa de 96 poços e imediatamente foram incubadas em anaerobiose a 37°C, dando início à cronometragem da primeira hora.

A cada hora uma alíquota de 100 μL referente ao tempo desejado foi retirada da placa de 96 poços que estava em incubação e então foi medida a $\text{D.O.}_{630\text{nm}}$ em espectrofotômetro. Posterior a medição, esta alíquota foi transferida para um micro-tubo contendo 900 μL de meio caldo TSB e a seguir, as suspensões bacterianas de cada micro-tubo foram diluídas seriadamente na base 10 até a diluição de $\sim 10^{-4}$ cél/mL. Um volume de 5 μL de cada suspensão a $\sim 10^{-4}$ cél/mL foi semeado em placa de Petri contendo meio de cultura sólido

RCA. As colônias bacterianas formadas foram contadas entre 24 - 48 horas de crescimento.

3.3.3. Fotossensibilizador e fonte de Luz

O fotossensibilizador utilizado neste estudo foi a curcumina sintetizada pelo grupo de pesquisa do Dr. Kleber Thiago de Oliveira, professor do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, SP. (UFSCar).

A curcumina foi diluída inicialmente em solvente DMSO e posteriormente, a partir dessa solução, para a realização dos ensaios esse FS foi diluído em caldo TSB e também em solução de sacarose 0,5% a fim de se obter as concentrações desejadas, utilizando micro-tubos, que foram envolvidos em papel alumínio para que o FS não fosse exposto à luz durante a realização do experimento, bem como a placa de 96 poços utilizada para o ensaio, até o momento da irradiação. O tempo de pré-incubação da bactéria com as soluções do FS foi de 5 minutos para os experimentos em fase planctônica e biofilme.

Devido ao espectro de absorção da curcumina a fonte de luz utilizada nesta pesquisa foi um sistema LED azul no comprimento de onda de 450 nm (figura 2).

Figura 2 – Fonte de luz LED no de comprimento de onda de 450 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.4. Espectro de absorção da solução de Curcumina

O espectro de absorção de luz de diferentes soluções foi realizado no equipamento Synergy H1M. Uma alíquota de 100 μL da amostra de interesse foi adicionada em um poço de placa de 96 poços e uma alíquota de 100 μL do branco foi adicionada no mesmo momento em um poço diferente, a seguir, a leitura foi realizada.

3.3.5. Terapia Fotodinâmica

A luz foi entregue de forma a cobrir toda a extensão dos poços das placas de 96 poços irradiados. O formato de feixe gerado por este sistema permite uma irradiação pontual pelo spot uniformemente circular formado. De acordo com a potência de cada LED, com as dimensões do campo de irradiação e com o tempo de exposição da luz, foi então definida a fluência (densidades de energia ou dose de luz) empregada. A fórmula utilizada para que fosse calculada a dose de luz segue abaixo:

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

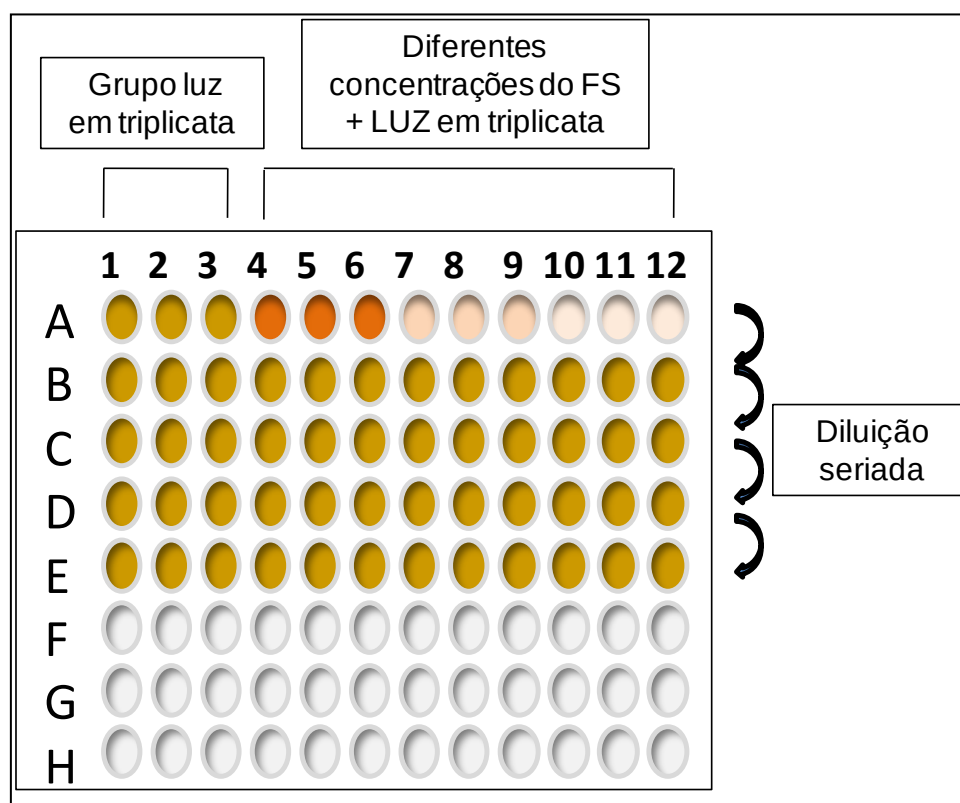
A fim de evitar qualquer tipo de interferência durante a irradiação cada placa recebeu apenas um tipo de tratamento.

3.3.6. Avaliação da viabilidade celular em fase planctônica (UFC/mL)

As soluções do FS foram preparadas em micro-tubos estéreis com o dobro da concentração de trabalho desejadas. A seguir, alíquotas de 50µL desse FS nas concentrações de interesse foram adicionadas em poços de uma placa de 96 poços, em triplicata. A cepa bacteriana crescida em placa de Petri contendo agar, em estufa a 37°C, anaerobiose, foram raspadas da placa e suspensas em 5 mL de caldo TSB em quantidade suficiente para formar uma suspensão com turbidez equivalente 0,5 da escala turbidimétrica de *Mc Farland*, confirmando-se a leitura da densidade óptica em 630 nm ($D.O_{630nm}$) para 0,08 - 0,1 ($\sim 1 \times 10^8$ cél/mL), utilizando Espectrofotômetro.

Alíquotas de 50 µL da suspensão com D.O. 0,08-0,1 foram transferidas para cada um dos poços da placa de 96 poços contendo as soluções preparadas, resultando em um volume final de 100 µL por poço e na diluição das soluções e do inóculo em 50% (concentração final de células $\sim 5 \times 10^7$ cél/mL). Terminado o tempo de incubação dos tratamentos, as suspensões bacterianas de cada poço foram diluídas seriadamente na base 10 até a concentração de $\sim 10^{-4}$ cél/mL. Um volume de 5 µL de cada suspensão a $\sim 10^{-4}$ cél/mL foi semeado em placa de RCA. As colônias bacterianas formadas foram contadas após 1-2 dias de crescimento.

Figura 3 – Representação do esquema da placa de 96 poços utilizada para o teste de susceptibilidade de TFDa em fase planctônica.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A técnica representada através da figura 3 foi padronizada no laboratório de Microbiologia Clínica através da comparação com o protocolo tradicional de contagem de UFC e a análise estatística dos resultados revelou que não há diferença entre as técnicas.

A fórmula utilizada para o cálculo da UFC/ mL foi a seguinte:

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

Nessa fórmula n representa o valor absoluto da diluição e q a quantidade pipetada em mL a ser semeada na placa contendo meio sólido. Neste estudo, $q = 0,005$, pois o valor pipetado para o plaqueamento foi de 5 μL .

3.3.7. Grupos avaliados em fase planctônica

Para a realização desse ensaio os grupos avaliados foram:

- Grupo controle negativo

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

- Grupo luz

Neste grupo foi avaliado se a aplicação da luz na ausência do fotossensibilizador poderia apresentar efeitos tóxicos para *P. acnes*. Dessa forma, alíquotas de 50 µL da suspensão bacteriana foram transferidas para um dos poços de uma placa de 96 poços. A seguir, alíquotas de 50 µL de caldo TSB foram transferidas para o poço. Essa amostra foi mantida durante 5 minutos no escuro e em seguida foi realizado o ensaio com as doses de luz desejadas.

- Grupo Fotossensibilizador diluído em caldo TSB

Para avaliação da toxicidade da curcumina sobre a suspensão celular, foram incluídas neste estudo amostras inoculadas com esse fotossensibilizador e que foram mantidas no escuro. Alíquotas de 50 µL da suspensão celular de *P. acnes* foram transferidas para poços de uma placa de 96 poços. Em seguida, alíquotas de 50 µL do fotossensibilizador foram acrescentadas nos poços, nas concentrações de trabalho desejadas.

- Grupo fotossensibilizador diluído em solução de sacarose 0,5%

Da mesma forma descrita no item anterior, a curcumina foi dissolvida em solução de sacarose 0,5% para avaliar a toxicidade das concentrações do FS na ausência de luz.

- Grupo TFDa (Curcumina dissolvida em caldo TSB)

Para avaliar a ação da TFDa, 50µL da suspensão de *P. acnes*, foi inoculada em placas de 96 poços. Em seguida, alíquotas de 50 µL do fotossensibilizador diluído em caldo TSB foram adicionadas aos poços e após o tempo de pré-incubação com os mesmos (5 minutos), a placa contendo as amostras, foi irradiada. As doses de luz empregadas para a realização dos ensaios foram: 18,75; 25; 37,5 e 50 J/cm² (107 mW/cm²) e as seguintes concentrações de curcumina avaliadas: 5; 7,5; 10; 15 e 20 µg/mL. O modo de irradiação empregado foi o modo fracionado, ou seja, a cada 60 segundos a irradiação cessava durante 60 segundos.

- Grupo TFDa (Curcumina dissolvida em solução de sacarose 0,5%)

Esse grupo foi inserido para avaliar a ação da TFDa, da mesma forma descrita no item anterior, no entanto, a curcumina foi dissolvida em solução de sacarose 0,5%. As doses de luz empregadas para a realização dos ensaios foram: 3,12; 6,25 e 12,5 J/ cm² (107 mW/cm²) em modo fracionado e as concentrações de curcumina utilizadas foram: 1,25; 2,50; 3,75, 5, 10 e 20 µg/mL.

- Grupo sacarose 0,5%

Neste grupo foi avaliado se a solução de sacarose 0,5% tinha influência na viabilidade celular. Alíquotas de 50µL da solução foram adicionadas em poços de uma micro-placa e a seguir, o mesmo volume foi adicionado da suspensão bacteriana.

- Grupo DMSO 1%

Esse grupo avaliou se o DMSO a 1% (concentração final que o DMSO estava durante o teste) apresentou toxicidade para *P. acnes*. Os ensaios foram realizados inoculando 50 µL do meio de cultura contendo o DMSO a 2% em um poço de placa de 96 poços e posteriormente foi adicionado ao mesmo poço 50 µL da suspensão bacteriana (concentração final do DMSO 1%).

Os tempos de irradiação do grupo TFDa e incubação do grupo controle negativo e do grupo fotossensibilizador encontram-se na tabela abaixo:

Tabela 1 – Tempo de irradiação do grupo TFDa em doses de luz específicas e tempo de incubação dos grupos que não foram irradiados em fase planctônica

Dose de luz	Tempo de irradiação (grupo TFDa)	Tempo de incubação (grupo sem irradiação)
3,12 J/cm (33 mW/cm ²)	1 min. e 34 seg.	6 min. e 34 seg.
3,12 J/cm (107 mW/cm ²)	29 seg.	5 min. e 29 seg.
6,25 J/cm (107 mW/cm ²)	58 seg.	5 min. e 58 seg.
12,5 J/cm (107 mW/cm ²)	4 min. e 29 seg.	9 min. e 29 seg.
18,75 J/cm (107 mW/cm ²)	6 min. e 24 seg.	11 min. e 24 seg.
37,5 J/cm (107 mW/cm ²)	12 min.	17 min.
50 J/cm (107 mW/cm ²)	15 min. e 57 seg.	20 min. e 57 seg.

Fonte: Elaborado pelo autor.

É importante mencionar que o tempo de incubação contabilizado para as amostras que não sofreram irradiação, tais como o grupo controle negativo, grupo FS, grupo DMSO 1% e grupo sacarose 0,5% foi de 5 minutos, somado ao tempo que essa amostra seria irradiada, referente a cada dose de luz avaliada. Dessa forma, tanto as amostras irradiadas, quanto as não irradiadas, permaneceram na placa pelo menos tempo.

3.3.8. Desenvolvimento do biofilme e avaliação da viabilidade celular (UFC/mL)

O desenvolvimento do biofilme foi realizado de acordo com a técnica *in vitro* estabelecida por (FONTANA *et al.*, 2009). Dessa forma, placas com 96 poços, previamente preparadas como meio de cultura sólido RCA (150 µL por poço) enriquecidas com hemina, foram utilizadas. Para iniciar o crescimento do biofilme utilizamos 150 µL do inoculo bacteriano equivalente a 0,5 da escala turbidimétrica de *Mc Farland* ajustando-se a leitura da densidade óptica em 630nm (D.O._{630nm}) para 0,08-0,1 (~1x10⁸ cél/mL). Cuidadosamente preenchemos cada poço da placa com 150 µL da amostra bacteriana e incubamos em anaerobiose a 37°C por sete dias. Durante as primeiras 48 horas de incubação, não foi realizada nenhuma troca de meio. Somente a partir

do terceiro dia, o meio antigo foi aspirado e renovado diariamente com 150 µL de caldo TSB enriquecido com hemina para cada poço, até o sétimo dia, quando atinge seu estado maduro. Sendo assim, o tratamento foi realizado no sétimo dia.

O biofilme foi incubado durante 5 minutos com as concentrações de FS testadas e posteriormente as amostras foram irradiadas. Após o tratamento, cada poço contendo as amostras foi cuidadosamente raspado com uma alça de inoculação de 1 µL para que o biofilme fosse desprendido e então esse biofilme foi transferido para um micro-tubo onde foi realizada a diluição seriada e posteriormente uma alíquota de 5 µL de cada suspensão a $\sim 10^{-5}$ cél/mL foi semeada em placa de Petri contendo o meio sólido RCA. Após o plaqueamento, as placas foram incubadas em anaerobiose a 37°C. As colônias bacterianas formadas foram contadas após 24-48 horas de crescimento.

3.3.9. Quantificação da biomassa total

Para a verificação da biomassa total do biofilme após as terapias propostas empregamos o método de quantificação de biomassa total por coloração com cristal violeta a 0,5% de acordo com metodologia empregada por PEETERS *et al.*, 2008. Devido aos processos de lavagem e leitura em espectrofotômetro, neste experimento de quantificação, a formação do biofilme seguiu a metodologia de FONTANA *et al.*, 2009 modificado, pois nesta etapa as placas não obtiveram suas bases suplementadas com agar enriquecido. Após o tratamento do biofilme, este foi lavado duas vezes com 200µL de tampão fosfato de potássio (PBS) para que fosse retirado o FS e as células que foram depreendidas após o tratamento. As células que não foram removidas com a lavagem foram fixadas no fundo da placa com 200µL de metanol durante 15 minutos. Em seguida, removeu-se o metanol e a placa foi mantida a 37°C por aproximadamente 20 minutos para secagem. Posteriormente, 200µL de corante cristal violeta 0,5% foi adicionado e mantido por 5 minutos. Lavou-se com água ultra-pura cada poço da placa e, em seguida, foi adicionado ácido acético 33% para remoção do corante. Uma alíquota de 100µL desse produto resultante foi transferida para o poço de uma placa de leitura e o resultado desta reação química foi medido utilizando-se o espectrofotômetro em 570nm.

3.3.9.1. Inibição da formação do biofilme

A inibição da formação do biofilme foi avaliada através da coloração com cristal violeta 0,5%. O tratamento das amostras foi realizado conforme descrito no item 3.3.6. Após o tratamento, juntou-se o conteúdo dos três poços de cada grupo, em micro-tubos estéreis. Os mesmos foram centrifugados em 13000 RPM por 5 minutos, posteriormente, o FS foi retirado e as amostras foram lavadas com tampão PBS e centrifugadas novamente. Após a centrifugação, o pellet foi ressuspenso em 50 µL de caldo TSB, e uma alíquota de 50 µL foi dispensada em cada poço referente ao grupo pertencente. Após esse procedimento a placa foi embalada em plástico filme e incubada em anaerobiose por 24 horas a 37°C. Encerrado o período de incubação, as amostras foram coradas conforme descrito no item anterior (3.3.9.).

3.3.9.2. Grupos avaliados em biofilme

Os grupos avaliados nos estudos em biofilme envolvendo o teste de viabilidade celular através da contagem de UFC/mL, quantificação da biomassa total e inibição da formação do biofilme foram:

-Grupo controle negativo (CN)

Nenhum tratamento foi aplicado neste grupo. Alíquotas de 50 µL do caldo TSB foram dispensadas no biofilme maduro. Os resultados obtidos com as culturas dessas amostras foram utilizados como parâmetro para a comparação com aqueles obtidos com as culturas das amostras submetidas ao tratamento.

- Grupo luz

Neste grupo foi avaliado se a aplicação da luz na ausência do fotossensibilizador poderia apresentar efeitos tóxicos para *P. acnes*. Dessa forma, alíquotas de 50µL de caldo TSB foram adicionadas aos poços desejados. Essa amostra foi mantida durante 5 minutos no escuro e em seguida foi realizado o ensaio com as doses de luz desejadas.

-Grupo Fotossensibilizador diluído em caldo TSB

Para avaliação da toxicidade da curcumina sobre o biofilme bacteriano, foram incluídas neste estudo amostras inoculadas com esse fotossensibilizador dissolvido em caldo TSB que foram mantidas no escuro. Alíquotas de 50 µL do fotossensibilizador foram acrescentadas nos poços, nas concentrações de trabalho desejadas durante o tempo de pré – incubação, somado ao tempo referente a cada dose de luz.

- Grupo fotossensibilizador diluído em solução de sacarose 0,5%

Da mesma forma descrita no item anterior, a curcumina foi dissolvida em solução de sacarose 0,5% para avaliar a toxicidade das concentrações do FS na ausência de luz sobre o biofilme bacteriano.

- Grupo TFDa (Curcumina dissolvida em caldo TSB)

Para avaliar a ação da TFDa, alíquotas de 50 µL do FS diluído em caldo TSB foram dispensadas sobre os poços contendo o biofilme formado e após o tempo de pré-incubação com a curcumina a placa contendo as amostras, foi irradiada. As doses de luz empregadas para a realização dos ensaios foram: 60, 70 e 80 J/cm² (154 mW/cm²) em modo de irradiação fracionada e as concentrações de curcumina avaliadas foram: 25; 50; 75; 100 e 150 µg/mL.

- Grupo TFDa (Curcumina dissolvida em solução de sacarose 0,5%)

Esse grupo foi inserido para avaliar a ação da TFDa, da mesma forma descrita no item anterior, no entanto a curcumina foi dissolvida em solução de sacarose 0,5%. A dose de luz empregada nesse grupo foi 60 J/cm² em modo de irradiação fracionada (154 mW/cm²) e as concentrações do fotossensibilizador utilizadas foram as seguintes: 6,25; 12,5; 25 e 50 µg/mL.

- Grupo DMSO 1%

Esse grupo avaliou se o DMSO a 1% (concentração final que o DMSO estava durante o teste) apresentou toxicidade para *P. acnes*. Os ensaios foram realizados dispensando 50 µL do meio de cultura contendo o DMSO a 2% em poços de placa de 96 poços contendo o biofilme formado.

- Grupo sacarose 0,5 %

Esse grupo avaliou se a solução de sacarose 0,5% apresentou interferência no crescimento do biofilme de *P. acnes*. Os ensaios foram realizados dispensando 50 µL da solução de sacarose 0,5% em poços de placa

Os tempos de irradiação do grupo TFDa e incubação dos grupos que não foram irradiados encontram-se na tabela abaixo:

Tabela 2 – Tempo de irradiação do grupo TFDa em doses de luz específicas e tempo de incubação dos grupos que não foram irradiados em biofilme.

Dose de luz	Tempo de irradiação (grupo TFDa)	Tempo de incubação (grupo sem irradiação)
60 J/cm ² (154 mW/cm ²)	13 min. e 38 seg.	18 min. e 38 seg.
70 J/cm ² (154 mW/cm ²)	15 min. e 15 seg.	20 min. e 15 seg.
80 J/cm ² (154 mW/cm ²)	17 min. e 31 seg.	22 min. e 31 seg.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.9.3. Análise estatística

Para comparar os valores das variáveis contínuas entre os grupos foi utilizado teste de Análise de Variância (one-way ANOVA), com pós-teste de Tukey. As análises foram realizadas através do software Graph Pad Prism® Version 5.01 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0.05$. O Coeficiente de Variação máximo aceitável dos ensaios foi estipulado em 25%.

3.4. Método – Estudo II (Avaliação da atividade sinérgica da TFDa e tetraciclina)

A metodologia aplicada neste estudo foi realizada de acordo com a técnica *in vitro* de Ronqui *et al.*, 2016 modificada.

3.4.1. Concentração bactericida mínima (CBM)

A tetraciclina foi preparada de acordo com as recomendações do fabricante e posteriormente esse antibiótico foi diluído em caldo MH enriquecido com hemina para a realização dos ensaios. A fim de encontrar a concentração bactericida mínima desse antibiótico sobre *P. acnes* as seguintes concentrações foram avaliadas 0,25; 0,50; 1, 2, 4, 8, 16, 32 e 64 µg/mL. Essas concentrações foram preparadas em micro-tubos estéreis com o dobro da concentração de trabalho desejadas e um volume de 100 µL foi transferido para poços de uma placa de 96 poços, em duplicata. A seguir, uma alíquota de 100 µL do inóculo bacteriano ($\sim 1 \times 10^7$ cél/mL), foi dispensada em cada um dos poços contendo o antibiótico. Posteriormente, essa placa foi incubada em anaerobiose durante 24 horas, a 37°C. Após esse período de incubação foi realizada a diluição seriada na base de 10, até $\sim 10^{-4}$ cél/mL. A seguir uma alíquota de 2 µL foi plaqueada através do método da gota em agar Mueller Hinton (MH) enriquecido com hemina.

3.4.2. Terapia combinada em fase planctônica

A combinação das terapias foi realizada de duas formas: empregando a TFDa e posteriormente submetendo a amostra ao tratamento com a tetraciclina, como também empregando primeiramente o tratamento com o antibiótico e posteriormente à TFDa.

3.4.3. TFDa seguida de antibiótico

A TFDa foi realizada conforme descrito no item 3.3.6. Após o tratamento, foram transferidos para um micro-tubo o volume dos três poços, contendo um volume de 200 µL de suspensão bacteriana em cada poço, para a centrifugação a 13000 rpm por 5 minutos, a fim de retirar a solução de curcumina. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e uma alíquota de 600 µL de tampão PBS foi adicionada ao micro-tubo. A seguir, esse micro-tubo foi agitado em vórtex para que a amostra fosse lavada e foi levado novamente à centrífuga. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a amostra foi ressuspensa em 300 µL de caldo MH. Posteriormente, um volume de 100 µL dessa suspensão foi adicionado em três poços diferentes de uma micro-placa, contendo amostras de tetraciclina preparadas a uma concentração de 16 µg/mL. Após esse procedimento, a placa foi incubada nas condições

mencionadas anteriormente por 24 horas. Passado esse período, foi realizada a diluição seriada dessas amostras e uma alíquota de 5 μL de cada suspensão a $\sim 10^{-4}$ cél/mL foi semeada em placa de agar MH enriquecido. Após o plaqueamento, as placas foram incubadas em anaerobiose a 37 °C. As colônias bacterianas formadas foram contadas após 24 - 48 horas de crescimento.

3.4.4. Antibiótico seguido de TFDa

O tratamento com o antibiótico foi realizado da mesma forma descrita no item 3.4.1. Posteriormente ao tratamento, foi transferido para um micro-tubo o volume dos três poços, contendo um volume de 200 μL de suspensão bacteriana em cada poço, para a centrifugação a 13000 RPM por 5 minutos, objetivando retirar a solução de tetraciclina. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e uma alíquota de 600 μL de tampão PBS foi adicionada ao micro-tubo. A seguir, esse micro-tubo foi agitado, para que a amostra fosse lavada e foi levado novamente à centrífuga. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a amostra foi ressuspensa em 300 μL de caldo MH. A seguir, um volume de 100 μL dessa suspensão foi adicionado em três poços diferentes de uma micro-placa, contendo amostras de curcumina preparadas a uma concentração de 1,25 $\mu\text{g/mL}$. Após esse procedimento, a placa foi incubada com o fotossensibilizador em ambiente protegido da luz durante 5 minutos e a seguir, a placa foi irradiada. Após o tratamento a diluição seriada dessas amostras foi realizada e uma alíquota de 5 μL de cada suspensão a $\sim 10^{-4}$ cél/mL foi semeada em Agar MH enriquecido. Após o plaqueamento, as amostras foram incubadas em anaerobiose a 37°C. As colônias bacterianas formadas foram contadas após 24 – 48 horas de crescimento.

Para a realização deste ensaio foram avaliados os seguintes grupos:

- Grupo controle negativo (CN)

Neste grupo não foi aplicado nenhum tratamento. Alíquotas de 100 μL da suspensão celular de *P. acnes* foram transferidas para um dos poços de uma placa de titulação de 96 poços e a seguir, uma alíquota de 100 μL de caldo MH foi adicionada.

-Grupo TFDa

Alíquotas de 100 µL da suspensão celular de *P. acnes* foram transferidas para um dos poços de uma placa de titulação de 96 poços e a seguir, uma alíquota de 100 µL de curcumina dissolvida em solução de sacarose 0,5% na concentração de 1,25µg/mL foi adicionada. A dose de luz empregada para esse grupo foi 3,12 J/cm² (33mW/cm²).

- Grupo tetraciclina

Alíquotas de 100µL da suspensão celular de *P. acnes* foram transferidas para poços de uma placa de 96 poços. Em seguida, alíquotas de 100 µL da tetraciclina na concentração de 16 µg/mL foram acrescentadas nos poços.

- Grupo TFDa + tetraciclina

Neste grupo foi realizado primeiramente o tratamento com a TFDa e posteriormente com a tetraciclina.

- Grupo tetraciclina + TFDa

De forma contrária ao item anterior, neste grupo foi realizado primeiramente o tratamento com a tetraciclina e posteriormente o tratamento com a TFDa.

3.4.5. Terapia combinada em biofilme

O biofilme foi desenvolvido conforme descrito no estudo I, no entanto o meio caldo utilizado foi MH enriquecido com hemina. Da mesma forma realizada nos experimentos em suspensão, também avaliamos se a alternância dos tratamentos apresentaria resultados diferentes. Sendo assim, quando o biofilme encontrava-se em seu estado maduro, alíquotas de 150 µL do meio de cultura foi retirado cuidadosamente, e lavado com alíquotas de 150 µL de tampão PBS por duas vezes. Após a lavagem, todo o tampão foi removido do poço e uma alíquota de 50 µL do antibiótico a uma concentração de 16000 µg/mL foi adicionada aos poços, em quadruplicatas. Posteriormente, essa placa foi incubada novamente em anaerobiose a 37 °C. Passado esse período de incubação, a solução de antibiótico foi removida da placa, o biofilme foi lavado duas vezes com tampão PBS e uma alíquota de 50 µL da solução de FS a uma concentração de 6,25 µg/mL foi adicionado aos poços, pré-incubados com essa solução durante 5 minutos e levada a fonte de luz para

irradiação. Após a irradiação, o biofilme foi raspado com alça de inoculação de 1 µL e a diluição seriada na base de 10 foi realizada, seguida do plaqueamento em meio sólido de uma alíquota de 5 µL a $\sim 10^{-5}$ cél/mL. Após o plaqueamento, as placas de Petri contendo as amostras foram incubadas em anaerobiose a 37 °C durante 24-48 horas, e as unidades formadoras de colônias foram contabilizadas. Quando realizado o oposto, alíquotas de 150 µL do meio de cultura foram retiradas cuidadosamente dos poços contendo o biofilme maduro e essas amostras foram lavadas com alíquotas de 150 µL de tampão PBS por duas vezes. Após a lavagem, todo o tampão foi removido do poço e uma alíquota de 50 µL do FS foi adicionado aos poços, incubado com o biofilme durante 5 minutos e levado a irradiação. Após o tratamento foi realizada a diluição seriada, o plaqueamento e a amostra foi incubada conforme descrito anteriormente.

Neste estudo foram realizados também o teste de quantificação da biomassa total e inibição da formação do biofilme através do método de coloração por cristal violeta a 0,5%. A metodologia empregada foi a mesma descrita no estudo I. Os grupos avaliados nesse estudo foram:

- Grupo controle negativo (CN)

Neste grupo não foi aplicado nenhum tratamento. Alíquotas de 50 µL do caldo MH enriquecido foram dispensadas nos poços contendo as amostras de biofilme maduro.

-Grupo TFDa

Alíquotas de 50 µL da solução de FS dissolvida em sacarose 0,5% foram dispensadas nos poços contendo as amostras de biofilme maduro, incubadas por 5 minutos e a seguir essas amostras foram irradiadas

- Grupo tetraciclina

Nesse grupo alíquotas de 50 µL da solução de tetraciclina na concentração de 16000 µg/mL foram dispensadas nas amostras contendo biofilme.

- Grupo TFDa + tetraciclina

Neste grupo foi realizado primeiramente o tratamento com a TFDa e posteriormente com a tetraciclina.

- Grupo tetraciclina + TFDa

Neste grupo foi realizado primeiramente o tratamento com a tetraciclina e posteriormente o tratamento com a TFDa.

3.4.6. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Análise de Variância (one-way ANOVA), com pós-teste de Tukey. As análises foram realizadas através do software Graph Pad Prism® Version 5.01 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0.05$. O Coeficiente de Variação máximo aceitável dos ensaios foi estipulado em 25%.

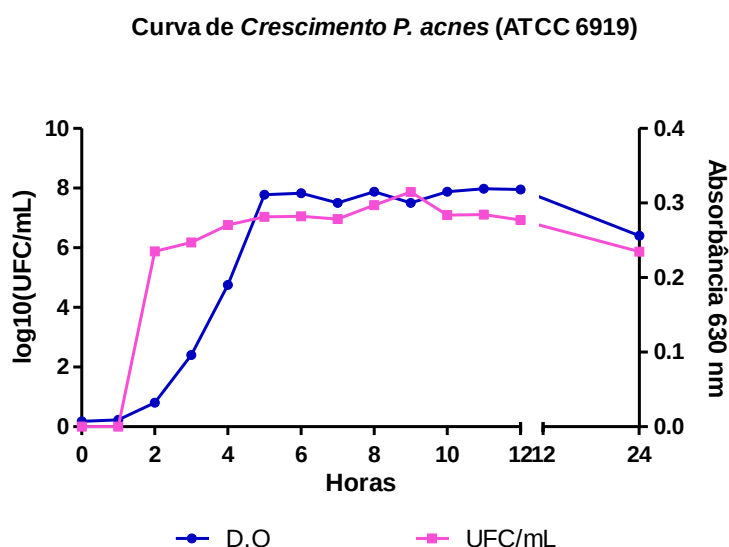
4. RESULTADOS

4.1. ESTUDO I

4.1.2. Curva de crescimento

A curva de crescimento de *P. acnes* (figura 4) foi realizada medindo a absorbância e adicionalmente foi avaliada a viabilidade celular através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

Figura 4: Curva de crescimento de *P. acnes* (ATCC 6919).



De acordo com os resultados obtidos foi possível observar que durante o período de 0-2 horas o micro-organismo está em fase de adaptação (fase lag). No período de 2-5 horas, *P. acnes* encontra-se em fase exponencial (fase log). A partir de 5 horas em diante tem início a fase estacionária e após 12 horas a população microbiana entra na fase de morte celular (fase de declínio).

4.1.3. Espectros de absorção de luz

Figura 5: Espectro de absorção da solução de curcumina diluída em TSB e água.

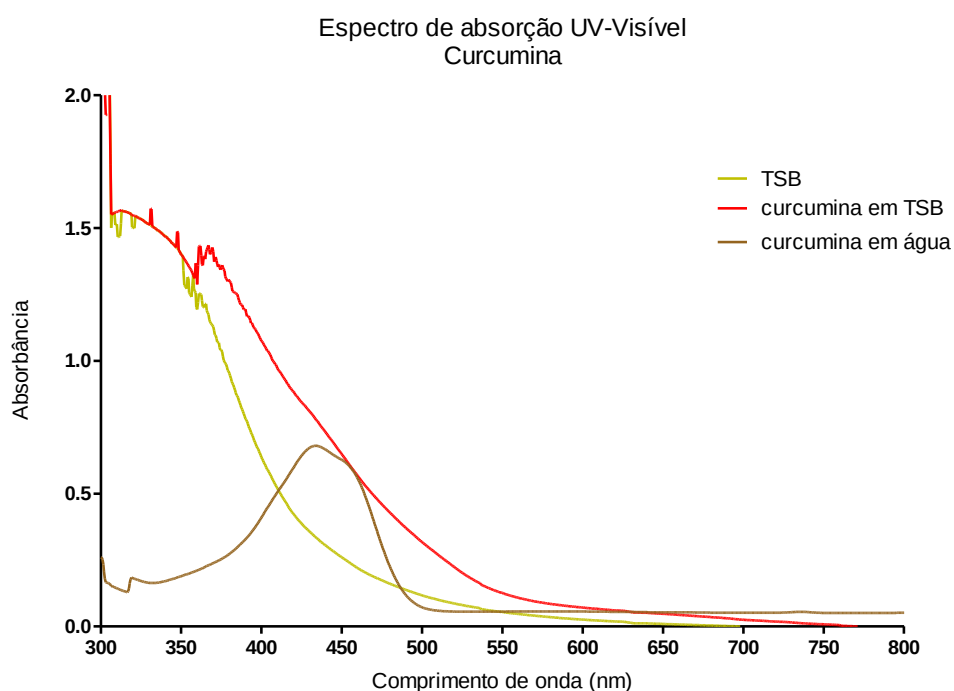


Figura 6: Espectro de absorção de luz da curcumina dissolvida em DMSO

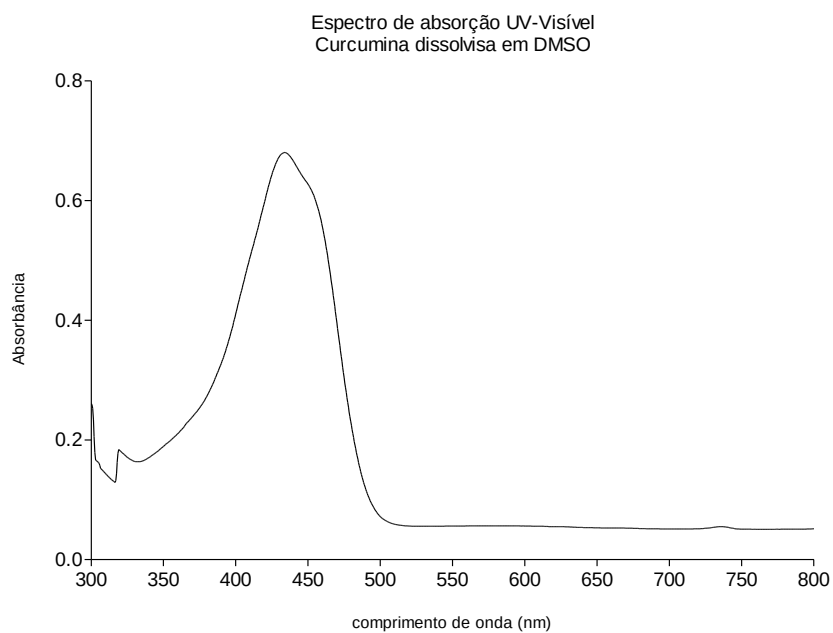


Figura 7: Espectro de absorção de luz da solução de curcumina diluída em sacarose 0,5%.

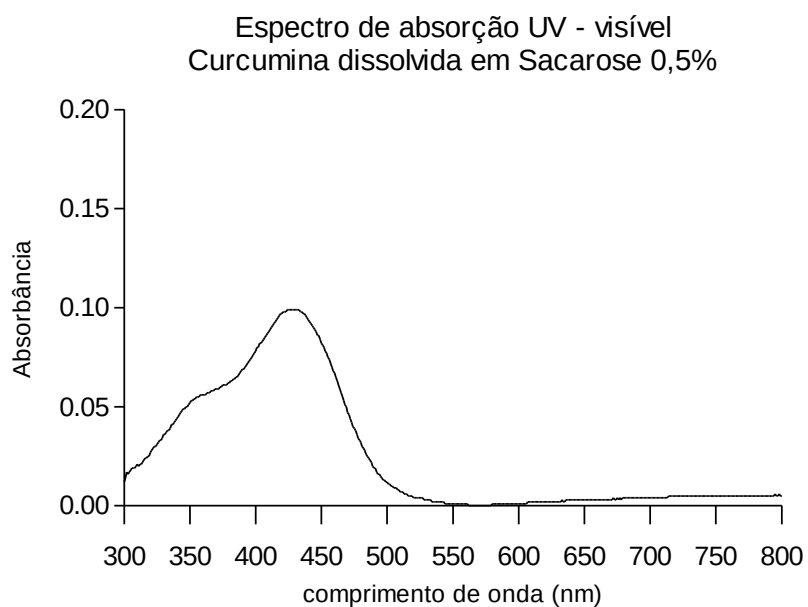
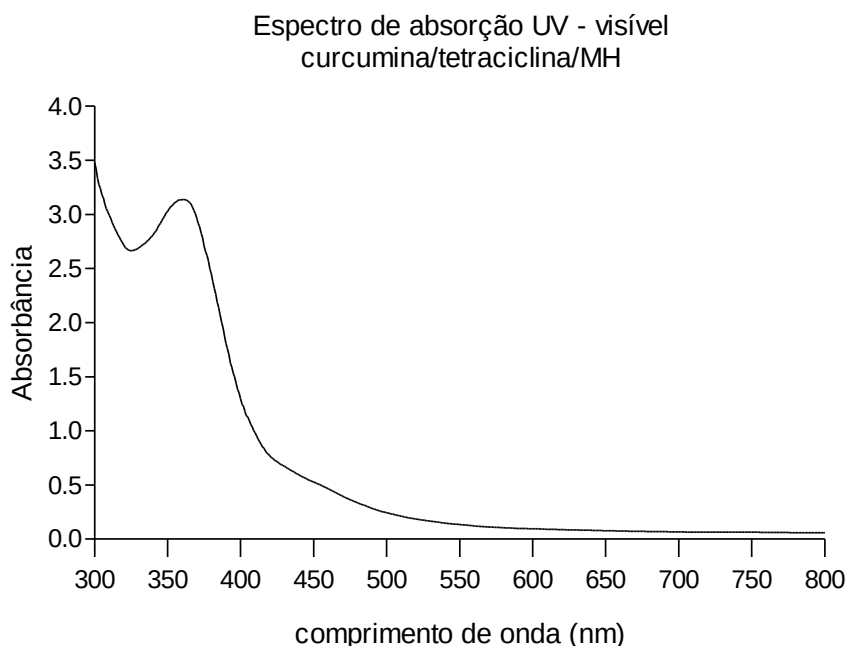


Figura 8: Espectro de absorção da solução de curcumina e tetraciclina diluída em caldo MH.

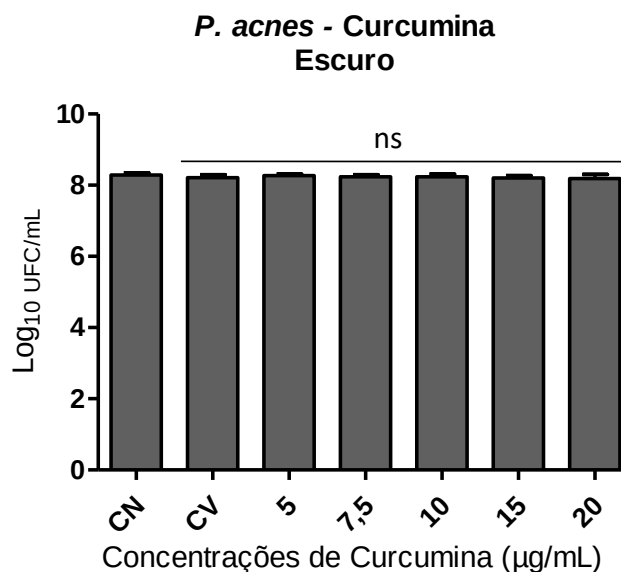


O resultado observado com os ensaios do espectro de absorção da curcumina dissolvida em DMSO, água e sacarose 0,5% evidenciou um pico de absorção próximo a 450nm (figura 5, 6 e 7). No entanto, os ensaios realizados com a curcumina dissolvida em TSB (figura 5) e solução contendo caldo MH, curcumina e tetraciclina mostraram picos abaixo de 400 nm (figura 8).

4.1.4. Terapia fotodinâmica mediada por curcumina dissolvida em caldo TSB em fase planctônica

Os resultados representados na figura 9 com o ensaio de atividade antimicrobiana na ausência de irradiação avaliando o grupo CN, CV e as concentrações de curcumina 5, 7,5 10, 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$ mostraram que o fotossensibilizador e o DMSO não apresentaram toxicidade para a bactéria.

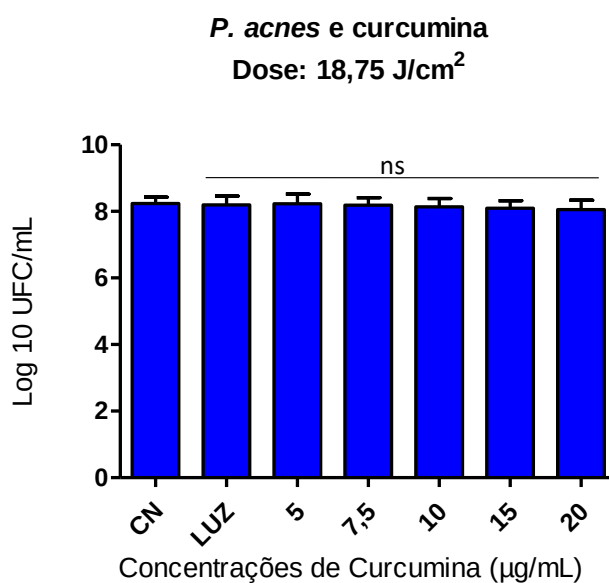
Figura 9: Avaliação da toxicidade da curcumina dissolvida em caldo TSB na ausência de irradiação.



Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle negativo(CN), controle de veículo (CV) e as concentrações de curcumina. As colunas representam os valores médios de log₁₀ de dois experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ns: (não significativo), representa a diferença estatística entre os grupos e o controle negativo (one-way ANOVA com pós teste de Tukey).

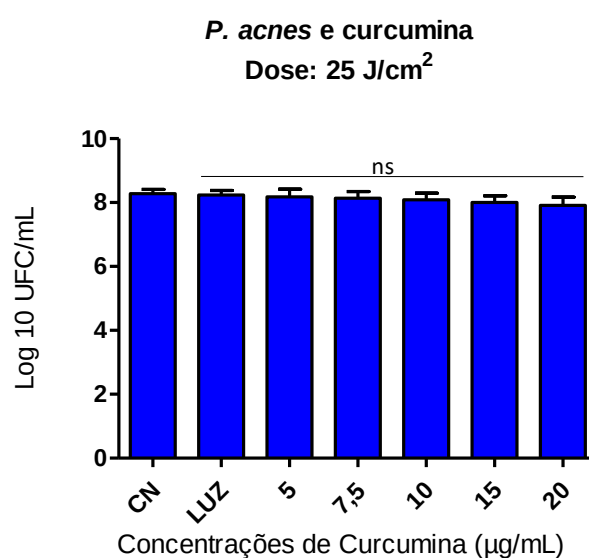
Nos ensaios de terapia fotodinâmica mediada por curcumina dissolvida em caldo TSB em fase planctônica os grupos avaliados foram: Controle negativo (CN), grupo luz e as seguintes concentrações de curcumina: 5; 7,5; 10; 15 e 20 µg/mL, associadas à irradiação de 18,75; 25; 37,5 e 50 J/cm², conforme mostram as figuras 10, 11, 12 e 13.

Figura 10: Avaliação da susceptibilidade bacteriana em fase planctônica empregando a terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por curcumina dissolvida em caldo TSB e LED 450 nm.



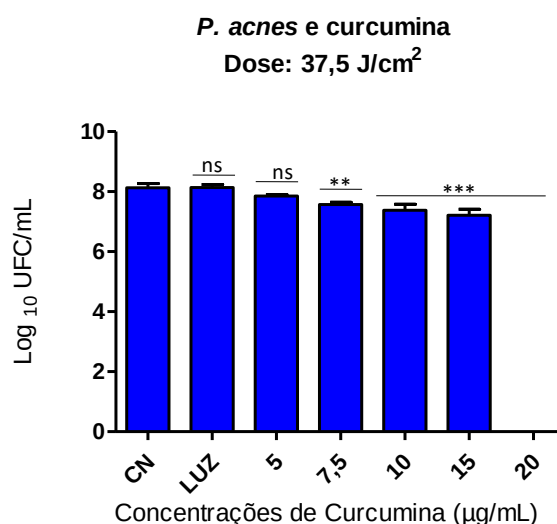
Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle negativo(CN), grupos luz e TFDa. As colunas representam os valores médios de log₁₀ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ns: (não significativo), representa a diferença estatística entre os grupos e o controle negativo (one-way ANOVA com pós teste de Tukey).

Figura 11: Avaliação da susceptibilidade bacteriana em fase planctônica empregando a terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por curcumina dissolvida em caldo TSB e LED 450 nm.



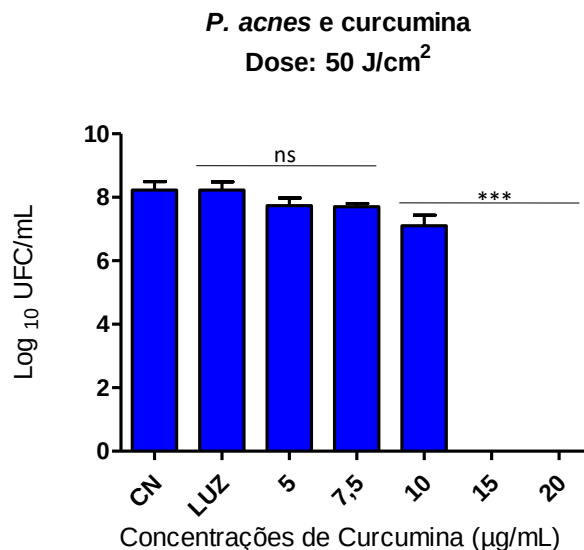
Valores médios de $\log_{10}$ entre os grupos controle negativo(CN), grupos luz e TFDa.As colunas representam os valores médios de $\log_{10}$ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ns: (não significativo), representa a diferença estatística entre os grupos e o controle negativo (one-way ANOVA com pós teste de Tukey).

Figura 12: Avaliação susceptibilidade bacteriana em fase planctônica empregando a terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por curcumina dissolvida em caldo TSB e LED 450 nm.



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

Figura 13: Avaliação da susceptibilidade bacteriana em fase planctônica empregando a terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por curcumina dissolvida em caldo TSB e LED 450 nm.



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

Os resultados apresentados nas figuras 10 e 11 demonstram que não houve redução microbiana quando comparado o grupo CN aos grupos de tratamento. No entanto, a partir da dose de luz de 37,5 J/cm², constatou-se uma redução gradual, apresentando uma redução de 8,13 log₁₀ (UFC/mL), quando utilizado o fotossensibilizador na concentração de 20µg/mL.

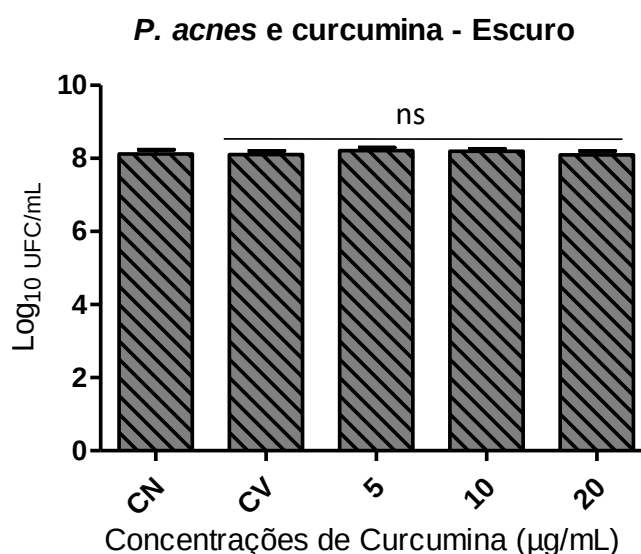
No ensaio utilizando a dose de luz de 50 J/cm² (figura 13), com as mesmas concentrações do fotossensibilizador utilizadas nos testes anteriores, foi possível observar uma redução de 8,22 log₁₀(UFC/mL) quando utilizadas as concentrações de 15 e 20 µg/ mL de curcumina. Podemos observar também neste ensaio uma redução de 1, 12 log₁₀(UFC/mL) no momento em que foi utilizada a concentração de 10 µg/ mL da curcumina.

Esses ensaios foram realizados em triplicata, envolvendo três experimentos independentes (n = 9).

4.1.5. Terapia fotodinâmica mediada por curcumina dissolvida em sacarose 0,5% em fase planctônica

Foi possível observar na figura 14 que o controle de veículo (sacarose 0,5%) e as concentrações de curcumina no valor de 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ não foram tóxicas para *P. acnes*.

Figura 14: Avaliação da toxicidade da curcumina dissolvida em solução de sacarose 0,5% na ausência de irradiação em *P. acnes* em fase planctônica.



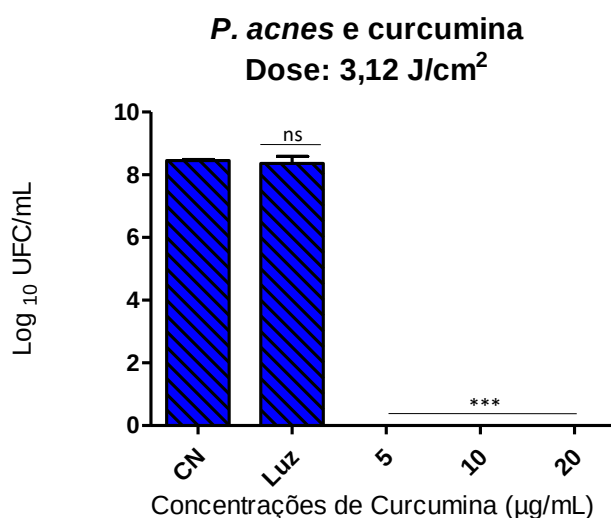
Valores médios de $\log_{10}$ entre os grupos controle negativo (CN), controle de veículo (CV) e as concentrações de curcumina. As colunas representam os valores médios de $\log_{10}$ de dois experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ns: (não significativo), representa a diferença estatística entre os grupos e o controle negativo (one-way ANOVA com pós teste de Tukey).

Foram realizados também experimentos diluindo a curcumina em solução de sacarose 0,5%. As concentrações de FS utilizadas foram 1,25; 2,50; 3,75; 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$, associadas a uma irradiação de 3,12; 6,25 e 12,5 J/cm^2 . Como podemos observar nas figuras 15, 17 e 18, todos os ensaios com exceção ao ensaio empregando a concentração de 1,25 $\mu\text{g/mL}$ associado à irradiação de 3,12 J/cm^2 (33 mW/cm^2) apresentaram uma redução maior que 8 $\log_{10}$ (UFC/mL) e nenhuma dose de luz foi tóxica para *P. acnes*.

O parâmetro aplicando a concentração de 1,25 $\mu\text{g/mL}$ associado à irradiação de 3,12 J/cm^2 (figura 16) foi considerado como sub-ótimo e foi utilizado no estudo II para combinar a TFDa com a tetraciclina.

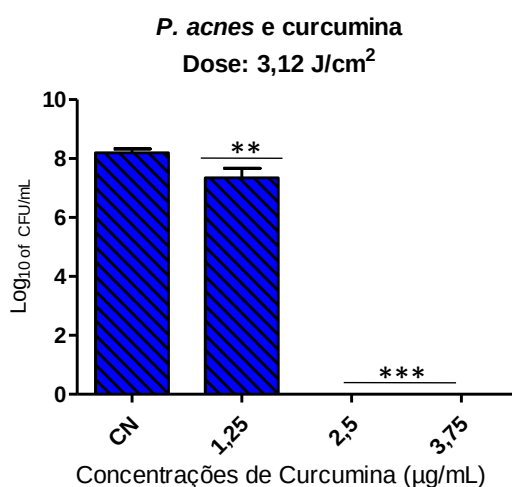
Todos os testes envolvendo este ensaio foram realizados em triplicata, em três ocasiões independentes ($n = 9$).

Figura 15: Avaliação da susceptibilidade bacteriana em fase planctônica empregando a terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por curcumina dissolvida em sacarose 0,5% e LED 450 nm.



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

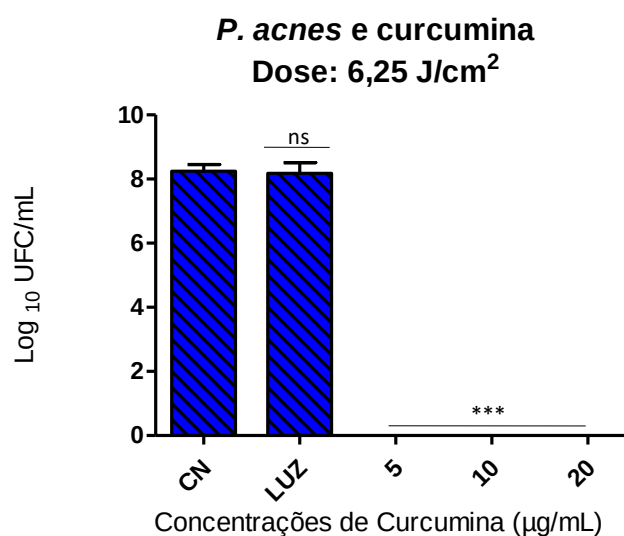
Figura 16: Avaliação da susceptibilidade bacteriana em fase planctônica empregando a terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por curcumina dissolvida em sacarose 0,5% e LED 450 nm.



Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle negativo (CN), grupos luz e TFD. As colunas representam os valores médios de log₁₀ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença

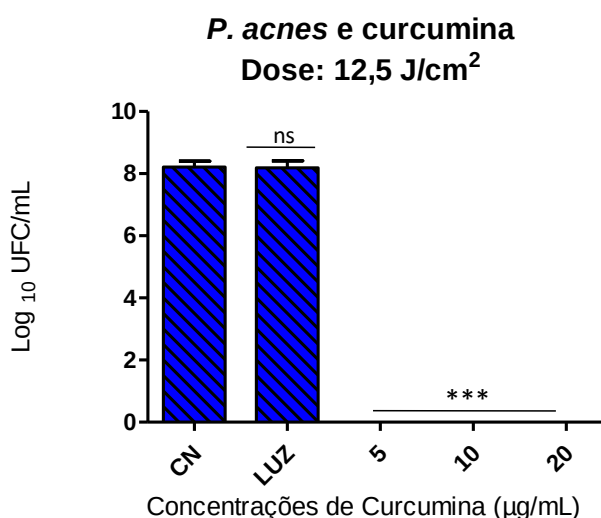
estatística entre os grupos e o controle negativo (one-way ANOVA com pós teste de Tukey) *** $p < 0,001$; ns: não significativo.

Figura 17: Avaliação da susceptibilidade bacteriana em fase planctônica empregando a terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por curcumina dissolvida em sacarose 0,5% e LED 450 nm.



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

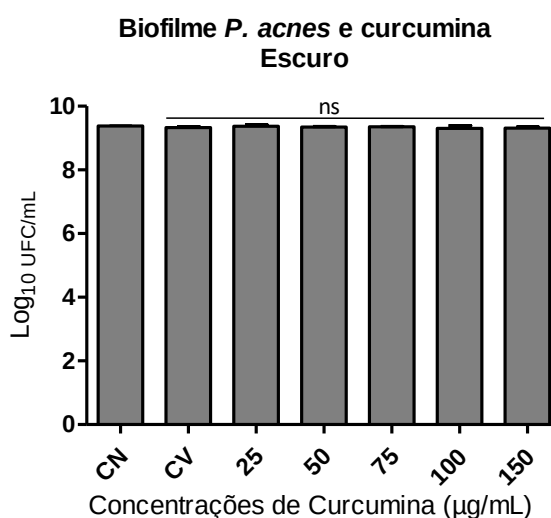
Figura 18: Avaliação da susceptibilidade bacteriana em fase planctônica empregando a terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por curcumina dissolvida em sacarose 0,5% e LED 450 nm.



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

4.1.6. Terapia fotodinâmica mediada por Curcumina dissolvida em TSB em biofilme

Figura 19: Avaliação da toxicidade da curcumina dissolvida em caldo TSB na ausência de irradiação em biofilme de *P. acnes*.

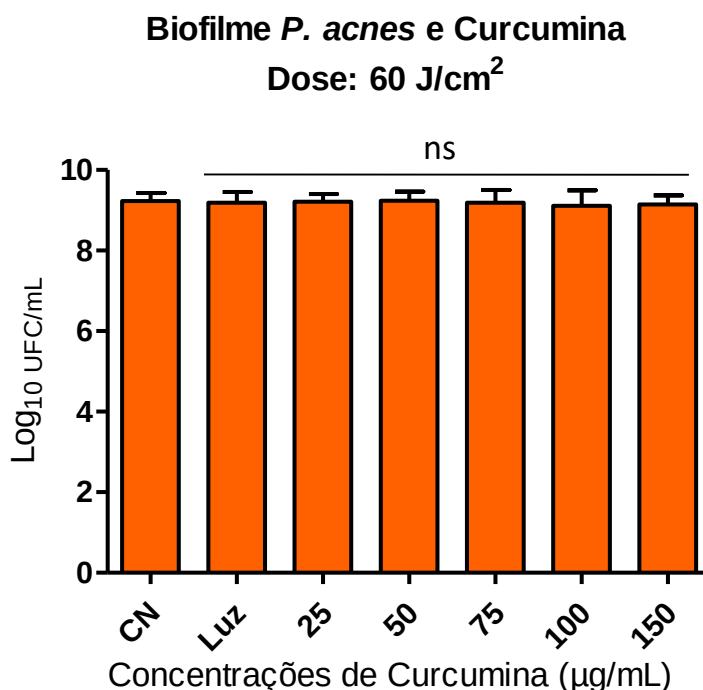


Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle negativo (CN), controle de veículo (CV) e as concentrações de curcumina. As colunas representam os valores médios de

$\log_{10}$ de dois experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ns: (não significativo), representa a diferença estatística entre os grupos e o controle negativo (one-way ANOVA com pós teste de Tukey).

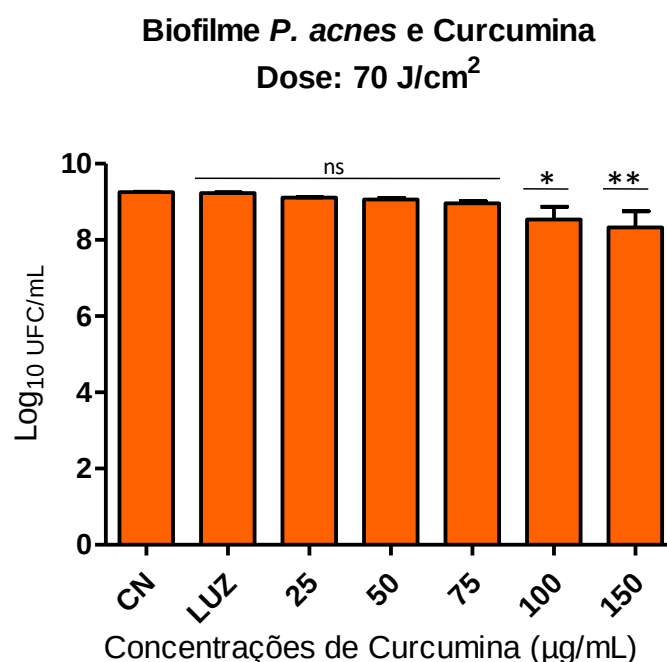
A partir dos resultados obtidos com o ensaio de susceptibilidade bacteriana na ausência de irradiação, a solução de DMSO a 1% (CV) e as concentrações de 25, 50, 75, 100 e 150 $\mu\text{g/mL}$ do fotossensibilizador foi possível verificar que não houve toxicidade do biofilme de *P. acnes* (figura 19).

Figura 20: Avaliação da susceptibilidade bacteriana em biofilme empregando a terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por curcumina dissolvida em caldo TSB e LED 450 nm.



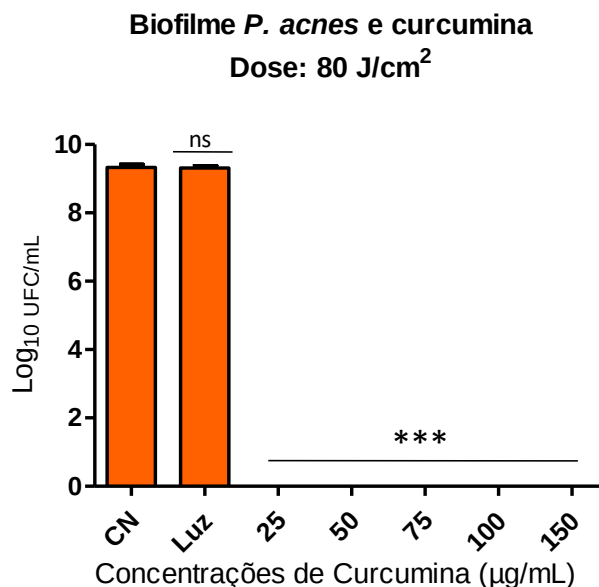
Valores médios de $\log_{10}$ entre os grupos controle negativo (CN), controle de veículo (CV) e as concentrações de curcumina. As colunas representam os valores médios de $\log_{10}$ de dois experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ns: (não significativo), representa a diferença estatística entre os grupos e o controle negativo (one-way ANOVA com pós teste de Tukey).

Figura 21: Avaliação da susceptibilidade bacteriana em biofilme empregando a terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por curcumina dissolvida em caldo TSB e LED 450 nm.



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

Figura 22: Avaliação da susceptibilidade bacteriana em biofilme empregando a terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por curcumina dissolvida em caldo TSB e LED 450 nm.



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

A partir dos resultados representados pelas figuras 20, 21 e 22 foi possível observar que não houve redução microbiana quando utilizadas as concentrações de curcumina de 25, 50, 75, 100 e 150 µg/mL, associadas à dose de 60J/cm². Constatou-se uma redução de 0,52 log₁₀ UFC/mL quando utilizada a concentração de 100 µg/mL da curcumina associada à dose de luz de 70J/cm², e uma redução de 0,92 log₁₀ UFC/mL quando utilizada a concentração de 150 µg/mL do fotossensibilizador, associada à mesma dose de luz (figura 21).

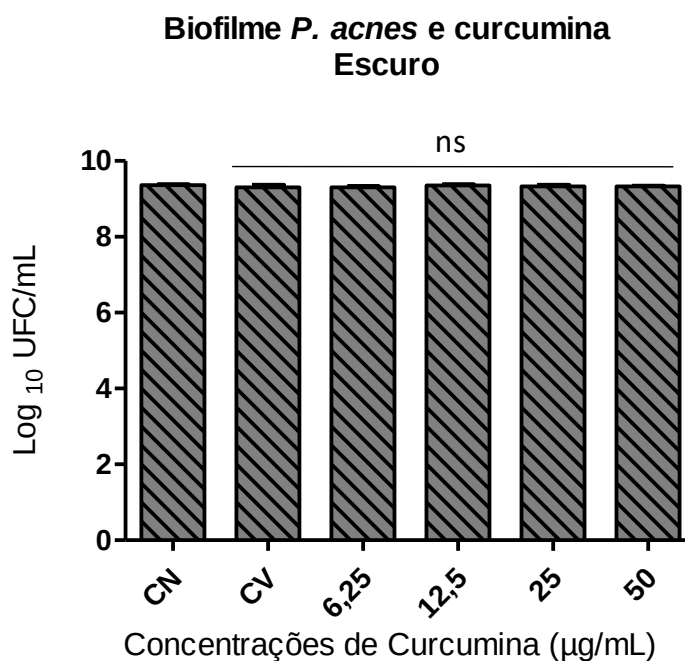
Não gráfico representado pela figura 22, observou-se uma redução total da carga microbiana utilizando as mesmas concentrações de curcumina dos ensaios anteriores de biofilme, mas, associadas a uma dose de luz de 80 J/cm².

Foram realizadas para cada ensaio, três ocasiões independentes em quadruplicatas (n = 12).

4.1.7. Terapia fotodinâmica mediada por Curcumina dissolvida em sacarose 0,5% em biofilme

Conforme o esperado, os resultados de avaliação da toxicidade da curcumina dissolvida em sacarose 0,5% demonstraram que as concentrações de curcumina avaliadas e a solução de sacarose 0,5% não são tóxicas para o biofilme de *P. acnes* isoladamente (figura 23).

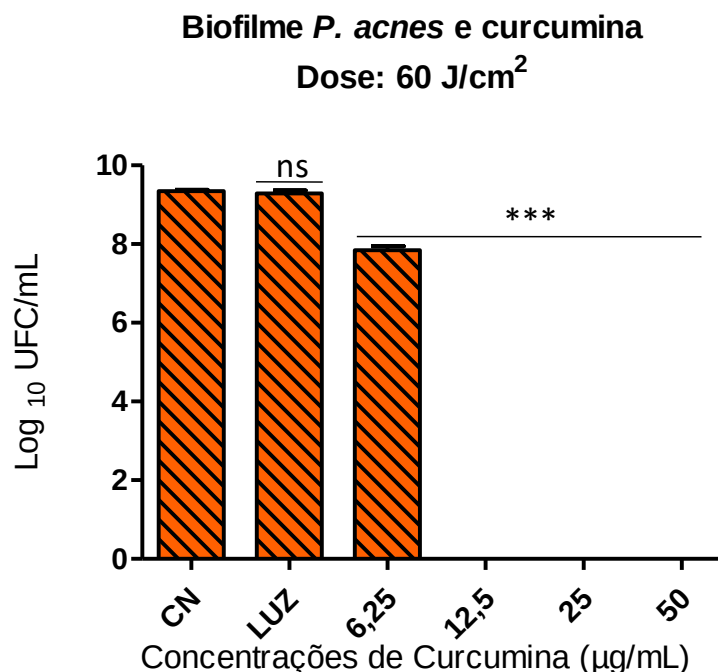
Figura 23: Avaliação da toxicidade da curcumina dissolvida em sacarose 0,5% na ausência de irradiação em biofilme de *P. acnes*.



Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle negativo (CN), controle de veículo (CV) e as concentrações de curcumina. As colunas representam os valores médios de log₁₀ de dois experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ns: (não significativo), representa a diferença estatística entre os grupos e o controle negativo (one-way ANOVA com pós teste de Tukey).

As concentrações de curcumina avaliadas neste estudo foram: 6,25; 12,5; 25 e 50 µg/mL associadas à dose de luz de 60 J/ cm².

Figura 24: Avaliação da susceptibilidade bacteriana em biofilme empregando a terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por curcumina dissolvida em caldo TSB e LED 450 nm.



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

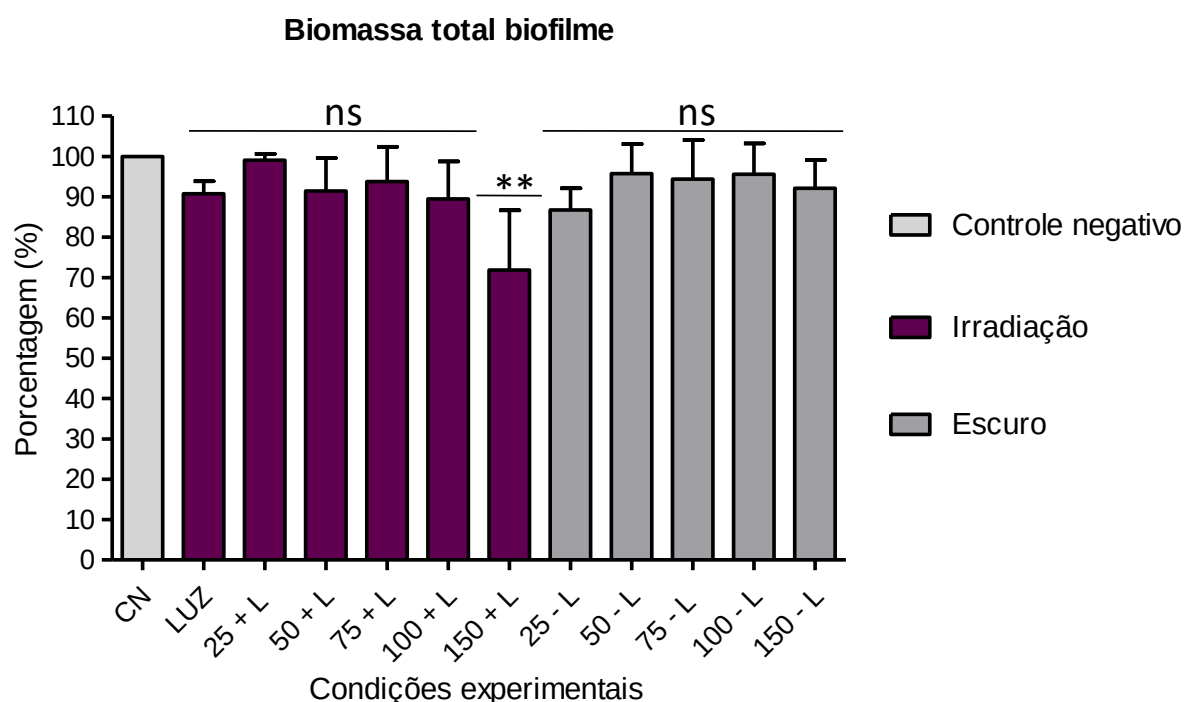
A partir dos resultados demonstrados na figura 24 foi possível observar uma redução total da carga microbiana quando utilizadas as concentrações 12,5; 25 e 50 µg/mL e uma redução parcial de 1,5 log₁₀ quando avaliada a concentração de 6,25 µg/mL.

O parâmetro em que a redução do biofilme foi parcial (6,25 µg/mL de curcumina associado à irradiação de luz LED 450 nm a uma dose de 60 J/ cm²) foi utilizado no estudo II para a realização da terapia combinada com o a tetraciclina.

4.1.8. Avaliação da biomassa total do biofilme – curcumina dissolvida em caldo TSB

O ensaio para a quantificação da biomassa total do biofilme foi realizado após o tratamento utilizando as seguintes concentrações de curcumina: 25; 50; 75; 100 e 150 µg/mL associadas à irradiação de 80 J/cm², além disso, foi realizado também o teste aplicando apenas o fotossensibilizador. Houve uma redução de 28,15% da biomassa total do biofilme tratado com TFD na concentração de 150 µg/mL ($p < 0,01$), no entanto, as demais concentrações estudadas não apresentaram diferença estatística significativa em relação ao grupo CN. No ensaio utilizando apenas o fotossensibilizador foi possível verificar que não houve redução da biomassa total (figura 25).

Figura 25: Avaliação da biomassa do biofilme de *P. acnes* após terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por curcumina dissolvida em caldo TSB e LED 450 nm.



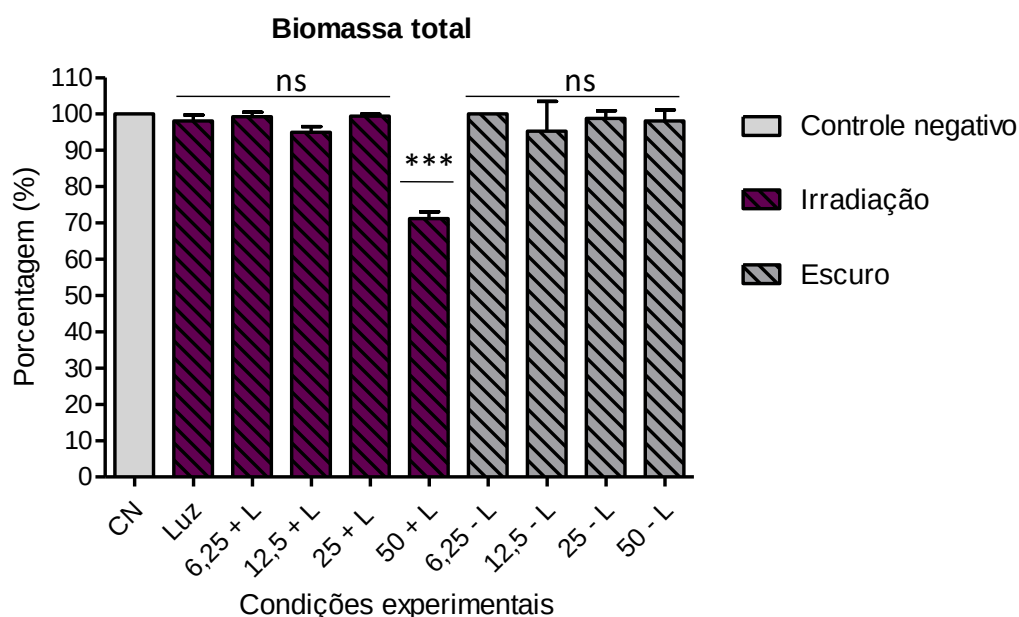
Valores médios de absorvância expressos em porcentagem (%) entre os grupos controle negativo (CN), grupo luz, grupo TFDa e grupo fotossensibilizador. As colunas representam os valores médios de absorvância expressos em porcentagem de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle negativo (one-way ANOVA com pós teste de Tukey) ** $p < 0,01$; ns: não significativo; + L (irradiação), -L (ausência de irradiação).

4.1.9. Avaliação da biomassa total do biofilme – curcumina dissolvida em sacarose 0,5%

A biomassa total do biofilme de *P. acnes* foi avaliada também após o tratamento com a TFDa mediada por curcumina dissolvida em solução de sacarose 0,5% nas seguintes concentrações 6,25; 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ associadas á irradiação de luz LED 450 nm de 60 J/cm^2 .

Os resultados obtidos com este ensaio, representados na figura 26, demonstraram uma redução de 28,84 % da biomassa total das amostras tratadas com a curcumina na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. As demais concentrações avaliadas não apresentaram redução estatisticamente significativa em relação ao grupo CN.

Figura 26: Avaliação da biomassa do biofilme de *P. acnes* após terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por curcumina dissolvida em sacarose 0,5% e LED 450 nm.



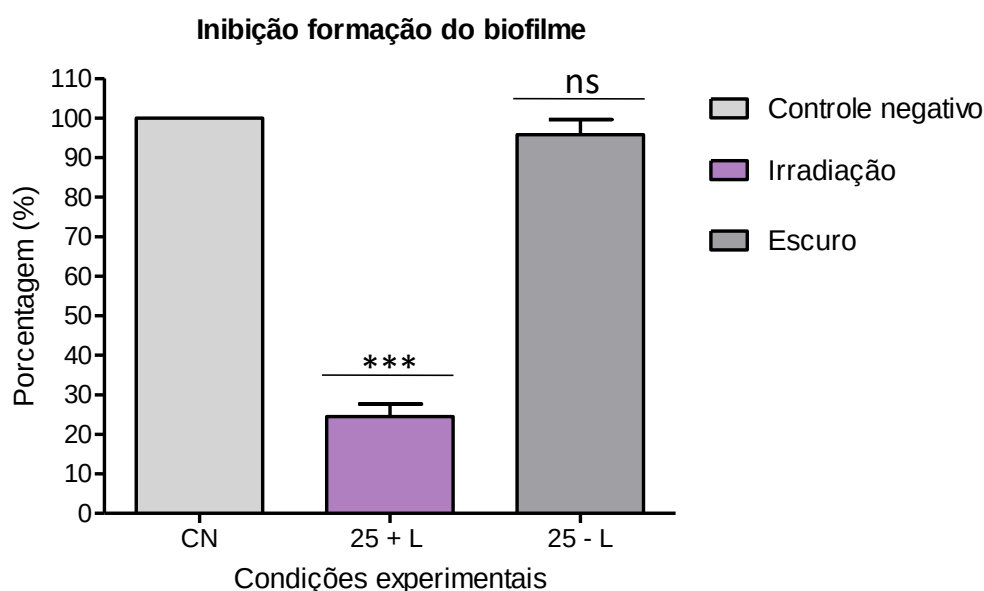
Valores médios de absorvância expressos em porcentagem (%) entre os grupos controle negativo (CN), grupo luz, grupo TFDa e grupo fotossensibilizador. As colunas representam os valores médios de absorvância expressos em porcentagem de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle negativo (one-way ANOVA com pós teste de Tukey) *** $p < 0,001$; ns: não significativo; + L (irradiação), - L (ausência de irradiação).

4.1.9.1. Inibição da formação do biofilme – curcumina dissolvida em caldo TSB

Os parâmetros que apresentaram melhores resultados nos ensaios de viabilidade celular através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) tanto nos ensaios no qual a curcumina foi dissolvida em caldo TSB quanto em solução de sacarose 0,5% foram utilizados nos ensaios de avaliação da inibição da formação do biofilme.

Nos resultados representados através da figura 27 podemos observar uma redução de 75,53% da inibição da formação do biofilme de *P. acnes* quando utilizada a concentração de 25 µg/mL de curcumina dissolvida em caldo TSB associada à irradiação de 80 J/ cm². O grupo avaliado contendo apenas a concentração de curcumina mencionada na ausência de irradiação não apresentou inibição estatisticamente significativa em relação ao grupo não tratada (CN).

Figura 27: Avaliação da inibição da formação do biofilme de *P. acnes* após terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por curcumina dissolvida em caldo TSB e LED 450 nm.



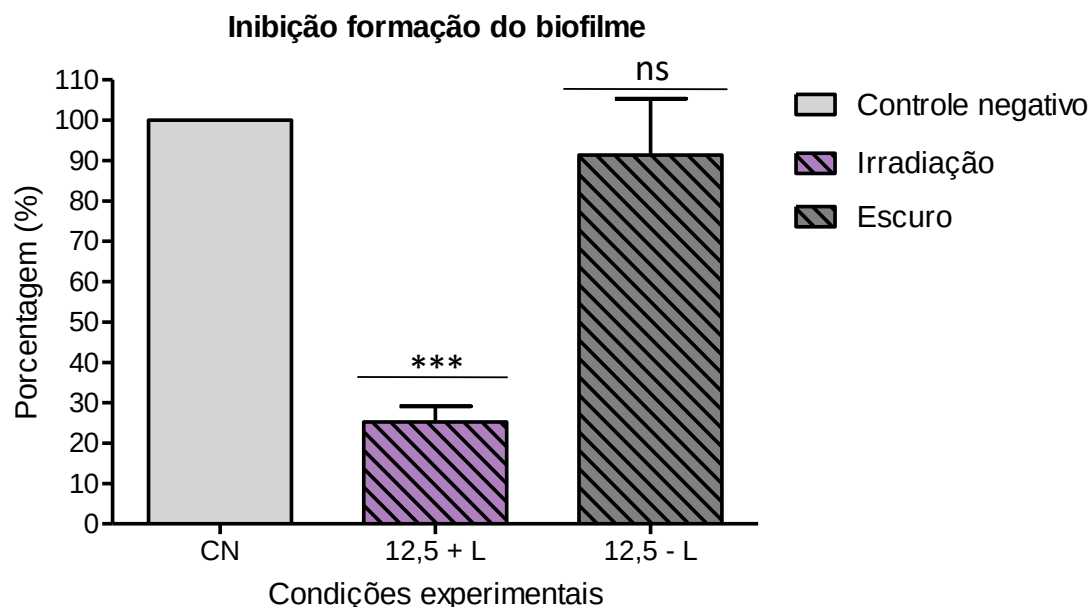
Valores médios de absorbância expressos em porcentagem (%) entre os grupos controle negativo (CN), grupo TFDa (25 µg/mL de curcumina + Luz) e grupo fotossensibilizador (25 µg/mL de curcumina - luz). As colunas representam os valores médios de absorbância expressos em porcentagem de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a

diferença estatística entre os grupos e o controle negativo (one-way ANOVA com pós teste de Tukey) *** $p < 0,001$; ns: não significativo.

4.1.9.2. Inibição da formação do biofilme – curcumina dissolvida em sacarose 0,5%

Os resultados de inibição da formação do biofilme após tratamento com a TFDa mediada por curcumina dissolvida em sacarose 0,5% na concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ e irradiação a uma dose de luz de 60 J/cm^2 , representados através da figura 28, demonstraram uma redução de 74,76% da inibição da formação do biofilme de *P. acnes*.

Figura 28: Avaliação da inibição da formação do biofilme de *P. acnes* após terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por curcumina dissolvida em sacarose 0,5% e LED 450 nm.



Valores médios de absorbância expressos em porcentagem (%) entre os grupos controle negativo (CN), grupo TFDa (12,5 $\mu\text{g/mL}$ de curcumina + Luz) e grupo fotossensibilizador (12,5 $\mu\text{g/mL}$ de curcumina - luz). As colunas representam os valores médios de absorbância expressos em porcentagem de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle negativo (one-way ANOVA com pós teste de Tukey) *** $p < 0,001$; ns: não significativo.

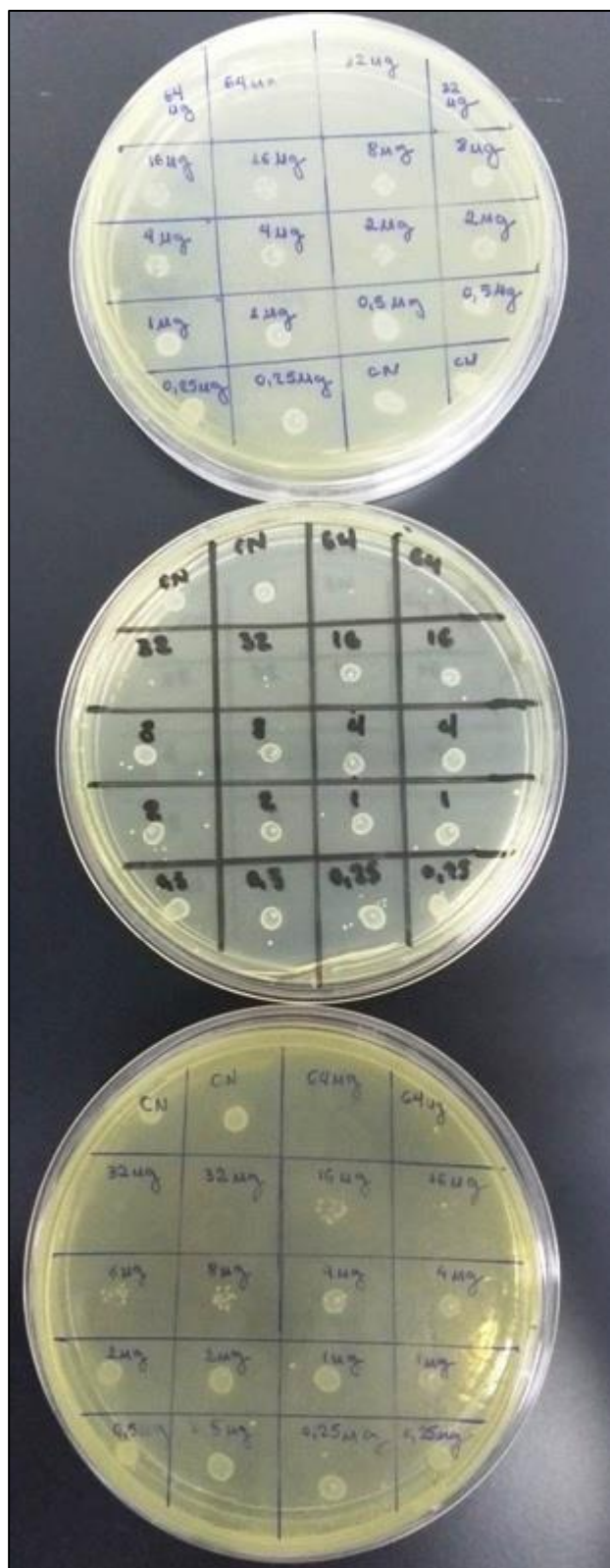
4.2. ESTUDO II

4.2.1. Concentração bactericida mínima (CBM)

As concentrações de tetraciclina avaliadas no ensaio objetivando encontrar a CBM foram: 0,25; 0,50; 1; 2; 4; 8; 16; 32; e 64 $\mu\text{g/mL}$. A CBM encontrada foi 32 $\mu\text{g/mL}$ enquanto que a concentração considerada sub-ótima obtida foi de 16 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$ foi selecionada para a realização dos testes com a terapia combinada com a TFDa.

O teste foi realizado em duplicata envolvendo três experimentos independentes ($n = 6$). A imagem dos ensaios realizados está representada na figura 29.

Figura 29: Representação do plaqueamento realizado para determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM).

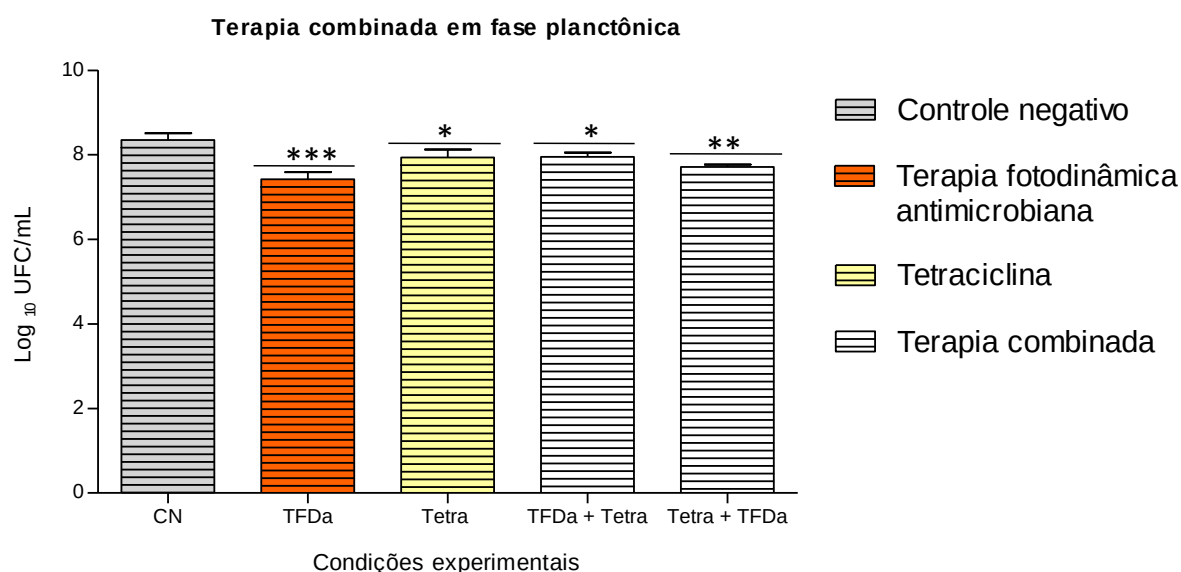


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.2. Avaliação da terapia combinada em suspensão

Os experimentos envolvendo as duas terapias associadas demonstraram uma redução de 0,40 $\log_{10}$ ($p < 0,05$) quando utilizado o parâmetro sub-ótimo da TFD combinado a concentração sub-ótima da tetraciclina e 0,63 $\log_{10}$ ($p < 0,01$) quando realizado o ensaio invertendo a ordem dos tratamentos, tetraciclina seguida de TFDa (figura 30). Os ensaios foram realizados em triplicata, em três diferentes ocasiões ($n=9$).

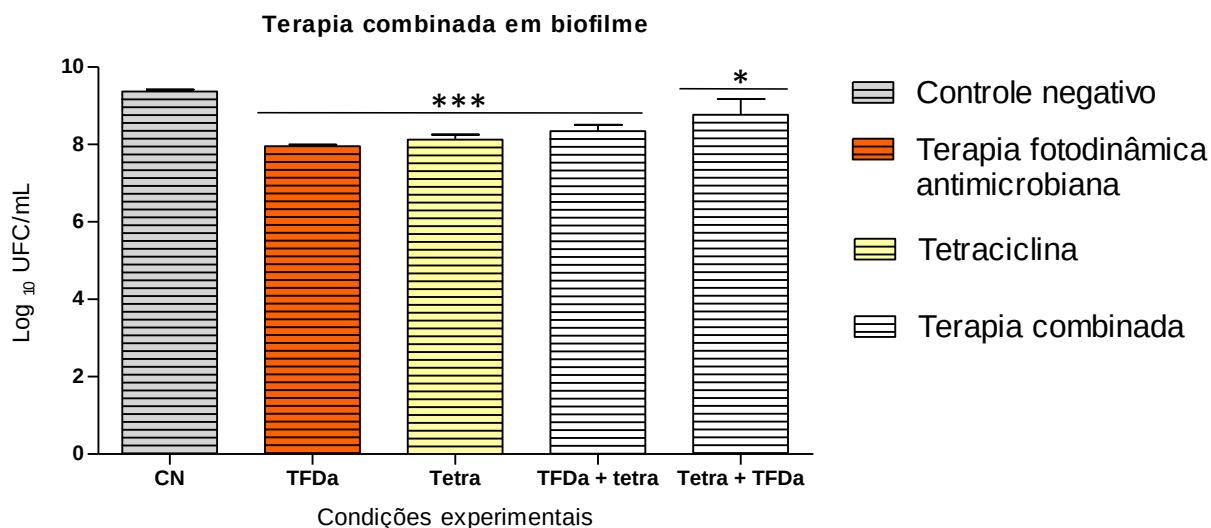
Figura 30: Avaliação da susceptibilidade bacteriana em fase planctônica empregando a terapia combinada



Valores médios de $\log_{10}$ entre os grupos controle negativo (CN), grupo terapia fotodinâmica (TFD,) grupo tetraciclina (Tetra) e o grupo sinergismo de terapia combinada. As colunas representam os valores médios de $\log_{10}$ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle negativo (one-way ANOVA com pós teste de Tukey) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$; ns: não significativo.

4.2.3. Avaliação da terapia combinada em biofilme

Figura 31: Avaliação da susceptibilidade bacteriana em fase planctônica empregando a terapia combinada

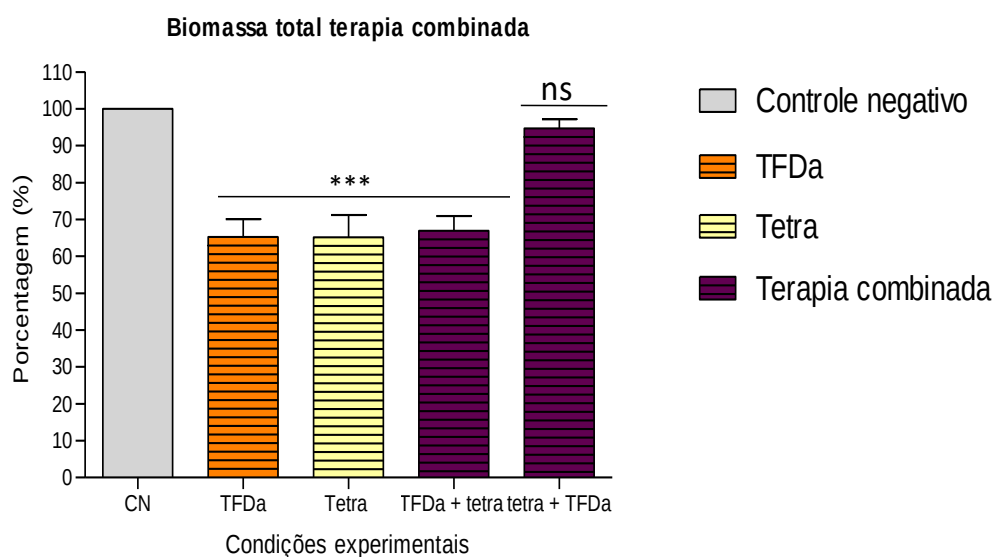


Valores médios de $\log_{10}$ entre os grupos controle negativo (CN), grupo terapia fotodinâmica (TFD,) grupo tetraciclina (Tetra) e o grupo sinergismo de terapia combinada. As colunas representam os valores médios de $\log_{10}$ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle negativo (one-way ANOVA com pós teste de Tukey) * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; ns: não significativo.

A terapia combinada aplicada nas amostras em biofilme de *P. acnes* (n=12) resultou em uma redução de 1,03 $\log_{10}$ ($p < 0,001$) quando aplicada primeiramente a TFDa seguida da antibioticoterapia e uma redução de 0,6 $\log_{10}$ ($p < 0,05$) quando a ordem dos tratamentos foi invertida (figura 31).

4.2.3. Avaliação da biomassa total - terapia combinada

Figura 32: Avaliação da biomassa total do biofilme de *P. acnes* após terapia combinada.

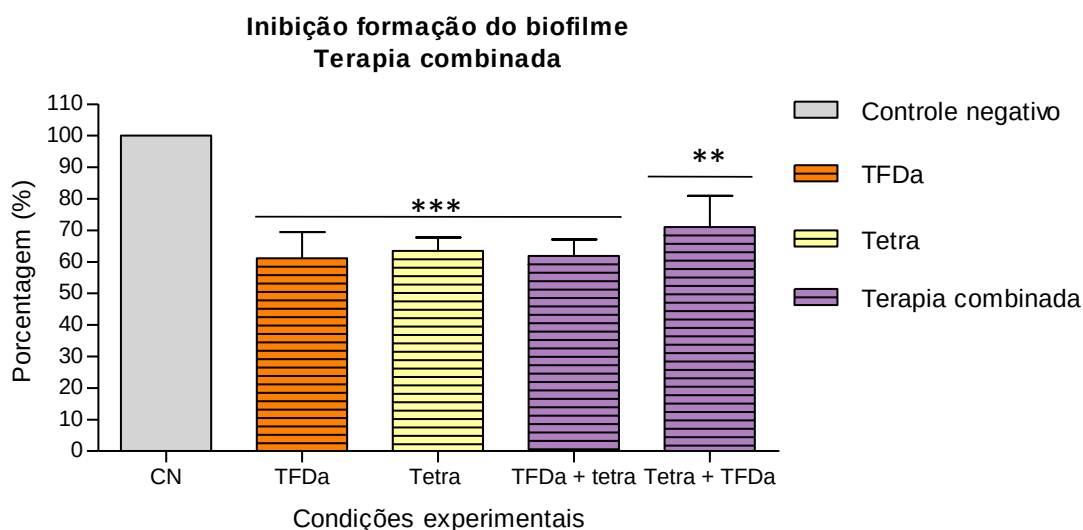


Valores médios de absorvância expressos em porcentagem (%) entre os grupos controle negativo (CN), e os grupos de terapia combinada. As colunas representam os valores médios de absorvância expressos em porcentagem de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle negativo (one-way ANOVA com pós teste de Tukey) *** $p < 0,001$; ns: não significativo.

Os ensaios de avaliação da biomassa total após terapia combinada ($n=12$) resultou na redução de 33,05% ($p < 0,001$) da biomassa total do biofilme bacteriano quando empregada a TFDa seguida do tratamento com a tetraciclina. O tratamento contrário não apresentou redução estatisticamente significativa comparada ao grupo CN (figura 32).

4.2.4. Avaliação da inibição da formação do biofilme – terapia combinada

Figura 33: Avaliação inibição da formação do biofilme de *P. acnes* após terapia combinada.



Valores médios de absorbância expressos em porcentagem (%) entre os grupos controle negativo (CN), e os grupos de terapia combinada. As colunas representam os valores médios de absorbância expressos em porcentagem de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle negativo (one-way ANOVA com pós teste de Tukey) ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: não significativo.

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de avaliação da inibição do sinergismo empregando a terapia combinada ($n=12$) foi possível observar uma inibição de 38,08% ($p < 0,001$) da formação do biofilme aplicando a TFDa primeiramente seguida da antibioticoterapia e a terapia aplicada de forma contrário resultou na inibição de 28,95% ($p < 0,01$) da formação do biofilme bacteriano (figura 33).

5. Discussão

O tratamento da acne tem sido um grande desafio na área da dermatologia devido à resistência bacteriana de *P. acnes* aos antibióticos utilizados contra este agente etiológico (COATES *et al.*, 2002; OPRICA *et al.*, 2004; NAKASE *et al.*, 2012) e aos efeitos adversos dos tratamentos convencionais. Neste contexto a TFDa vem sendo pesquisada como uma alternativa terapêutica para essa dermatose visando minimizar os efeitos

colaterais das terapias comumente utilizadas. Essa terapia além de ser capaz de eliminar *P. acnes* apresenta a vantagem de reduzir o tamanho das glândulas sebáceas e diminuir a produção de sebo (ALMEIDA ISSA e MANELA-AZULEY, 2010)

Os protocolos envolvendo TFDa para o tratamento da acne atualmente apresentam como base a síntese endógena de hematoporfirina proporcionada por compostos como o ácido-aminolevulínico (ALA), no entanto, essas aplicações envolvem um longo tempo de incubação, provocam dor, eritema, esfoliação, edema e queimação tornando o tratamento desconfortável para o paciente, além de o 5-ALA apresentar custo elevado (HONGCHARU *et al.*, 2000; YIN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010; MA *et al.*, 2013; MEI *et al.*, 2013; DONG *et al.*, 2016; FOX *et al.*, 2016)

O presente trabalho analisou o efeito da terapia fotodinâmica em *P. acnes* utilizando como fotossensibilizadora curcumina em diferentes concentrações e um sistema LED emissor de luz azul em diferentes doses de luz (Estudo I). Além disso, foram realizados experimentos combinando a TFDa com o antibiótico tetraciclina visando avaliar a possibilidade de sinergismo terapêutico na presença de tetraciclina (Estudo II).

Os ensaios envolvendo a TFDa foram realizados contra *P. acnes* em fase planctônica e biofilme. Em função da insolubilidade em água da curcumina, essa molécula foi diluída em DMSO e posteriormente em meio de cultura TSB para a realização dos primeiros ensaios, no entanto, ao longo do estudo testamos também a dissolução da curcumina em solução de sacarose 0,5%. A curcumina dissolvida em sacarose 0,5% possibilitou uma redução microbiana bastante significativa com baixas concentrações de fotossensibilizador e doses de luz, além de diminuir consideravelmente o tempo de irradiação das amostras. Essa solução dissolve de forma mais eficiente esse fotossensibilizador, comparada à dissolução com meio TSB, tornando-a mais disponível nos ensaios, o que justifica os resultados obtidos.

Foram realizados os testes de toxicidade para todas as concentrações de curcumina testadas nos ensaios de TFDa, em fase planctônica e biofilme. Nenhuma das concentrações testadas apresentou toxicidade para a bactéria. Esses dados coincidem com a literatura, pois o uso da curcumina como FS em

TFDa é bem estabelecida e não tem apresentado atividade bactericida quando aplicada isoladamente (ARAÚJO *et al.*, 2016).

Estudos aplicando a TFDa mediada pelos fotossensibilizadores azul de metileno e clorina-e6 têm apresentado eficiência desta terapia contra *P. acnes* (ZEINA *et al.*, 2001; JEON *et al.*, 2015). Para o nosso conhecimento, nenhum estudo avaliou a eficácia da TFDa mediada por curcumina utilizando LED azul (450nm) em culturas em fase planctônica ou biofilme de *P. acnes*. Sendo assim, não é possível realizarmos uma comparação direta com os dados disponíveis na literatura atualmente.

Nos ensaios de TFDa tanto em fase planctônica como em biofilme, onde em ambos os testes o FS foi dissolvido em caldo TSB, observamos claramente uma relação de dose de luz dependência para viabilidade bacteriana, onde a relação entre a sobrevivência ou morte depende mais da dose de luz aplicada do que a concentração de FS utilizada, pois a medida que aumentou-se a dose de luz utilizando as mesmas concentrações de FS a redução da viabilidade celular foi observada.

Nos ensaios de avaliação da biomassa total do biofilme após TFDa resultados muito semelhantes foram alcançados quando a curcumina foi solubilizada em caldo TSB e solução de sacarose 0,5%. No entanto, no ensaio em que a curcumina foi dissolvida em solução de sacarose 0,5% foi possível atingir uma redução com uma concentração de curcumina três vezes menor e uma dose de luz mais baixa. O mesmo padrão foi observado nos ensaios de inibição da formação do biofilme mostrando que a curcumina dissolvida em solução de sacarose 0,5% possibilita resultados satisfatórios utilizando menores concentrações do FS e doses de luz e estando de acordo com os dados obtidos na avaliação da viabilidade celular através da contagem de UFC/mL, onde esta diferença de susceptibilidade da curcumina dissolvida no caldo e na solução de sacarose 0,5% é nítida.

O teste de CBM buscou encontrar a concentração sub-ótima da tetraciclina sobre *P. acnes* para a realização dos experimentos de sinergismo. A CBM encontrada foi no valor de 32 µg/mL e a concentração sub-ótima determinada foi de 16 µg/mL sendo esse valor empregado para os

experimentos de terapia combinada em fase planctônica. Para a realização dos ensaios combinando as terapias em biofilme, esse valor foi multiplicado por 1000, baseado nas informações publicadas no estudo de Ceri *et al.*, onde ele encontrou a concentração inibitória mínima (CIM) para biofilme e *Staphylococcus aureus* sendo de 100 a 1000 vezes maior do que o valor do CIM em fase planctônica. Dessa forma em nosso estudo, utilizando 16000 µg/mL de tetraciclina foi possível alcançar uma redução do biofilme de 0,64 log₁₀UFC/ mL.

Os experimentos combinando a TFDa com a tetraciclina em fase planctônica mostraram que há uma pequena redução bacteriana combinando as duas terapias, no entanto essa redução não é maior quando comparada as duas terapias isoladamente, ou seja, não houve sinergismo. Esse resultado pode ser justificado a partir dos resultados mostrados no ensaio de espectro de absorção de luz da solução contendo caldo MH, curcumina e tetraciclina, pois há um deslocamento do pico de absorção para valores menores que 400 nm, tornando a TFDa menos efetiva.

Os ensaios de viabilidade celular através da UFC/mL empregando as duas terapias associadas em biofilme mostraram uma redução significativa em relação ao grupo CN do grupo onde a TFDa foi aplicada primeiramente, seguida da aplicação da tetraciclina, porém a análise estatística não mostrou diferença significativa entre esse grupo e o grupo TFDa, o qual avaliou apenas ação da TFDa, sugerindo que redução microbiana foi em decorrência da TFDa ou apenas da tetraciclina e não das duas terapias em conjunto. O grupo no qual a tetraciclina foi aplicada primeiramente, seguida da aplicação da TFDa apresentou uma redução quando comparado ao grupo CN, mas da mesma forma ao grupo citado anteriormente, não foi maior do que as terapias isoladas.

A avaliação biomassa total do biofilme após o tratamento das terapias combinadas mostram que o grupo em que a TFDa foi tratado primeiramente seguido do tratamento com a tetraciclina apresentou uma redução estatisticamente significativa em relação ao grupo CN, porém essa redução não apresentou diferença quando realizada a análise estatística em relação ao grupo TFDa e tetraciclina avaliados isoladamente. O grupo no qual a

tetraciclina foi aplicada primeiramente, não apresentou diferença estatística em relação ao grupo CN.

Em relação à avaliação da inibição de formação do biofilme associando as duas terapias, um padrão ao ensaio de biomassa total se repetiu, o grupo em que a TFDa foi empregado primeiramente seguido do tratamento com a tetraciclina apresentou uma redução estatisticamente significativa de acordo com a análise estatística empregada no estudo, porém, quando comparado ao grupo em que os dois tratamentos foram realizados isoladamente, essa diferença não foi verificada e o mesmo pode ser observado quando a ordem dos tratamentos foi contrária.

Estudos têm mostrado que um efeito bactericida maior poderia ser alcançado quando combinado o tratamento da TFDa com antibioticoterapia (CASSIDY *et al.*, 2001)

Em outros trabalhos realizados por DI POTO *et al.*, 2009 e SBARRA *et al.*, 2009 também foi verificado um aumento da susceptibilidade à vancomicina utilizando a TFDa previamente ao tratamento de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, rompendo a matriz protetora do biofilme, tornando essas bactérias sensíveis aos antibiótico. Porém em nosso estudo esse efeito não foi observado.

Quando realizado o tratamento com a tetraciclina seguido ao tratamento da TFDa era possível observar nitidamente que o biofilme ficava impregnado com a coloração amarela da tetraciclina, e quando realizado o tratamento com a TFDa certamente a coloração exerceu influência diminuindo a efetividade da TFDa como mostram nossos resultados do espectro de absorção do caldo MH com curcumina e tetraciclina. Esse inconveniente poderia ser solucionado com o aumento da concentração do FS e da dose de luz. Porém, visando uma aplicação clínica esse aumento se tornaria inviável. Além disso, os resultados obtidos no estudo I, aplicando a TFDa mediada por curcumina como monoterapia foram muito satisfatórios e promissores sendo capaz de reduzir totalmente a carga microbiana de biofilmes de *P. acnes* e inibir em mais de 70% a sua formação.

6. Conclusões

De acordo com as metodologias empregadas e as limitações desse estudo, podemos concluir que a TFDa mediada por curcumina aplicada como monoterapia foi eficiente para a redução microbiana de *P. acnes* em fase planctônica e biofilme. No entanto, a terapia combinada (Tetraciclina + TFD) não apresentou atividade sinérgica.

De forma pontual podemos concluir:

- 1- A aplicação da TFDa mediada por curcumina dissolvida em solução contendo caldo TSB apresentou redução de toda a carga microbiana de *P. acnes* em fase planctônica bem como em biofilme.
- 2- A TFDa mediada por curcumina dissolvida em solução contendo sacarose 0,5% foi eficaz na redução de contagem de colônias, possibilitando toda a redução da carga microbiana com baixas concentrações de curcumina e doses de luz menores comparada aos testes em fase planctônica com a curcumina dissolvida em solução contendo caldo TSB.
- 3- A biomassa total do biofilme foi reduzida em mais de 28% para a TFDa mediada por curcumina em caldo TSB e solução de sacarose 0,5%.
- 4- TFDa mediada por curcumina em caldo TSB e solução de sacarose 0,5% foi capaz de inibir em mais de 70% a formação do biofilme de *P. acnes*.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, R. G. R. et al. Could adult female acne be associated with modern life? **Archives of Dermatological Research**, v. 306, n. 8, p. 683-688, 2014.

ALLISON, R.R. et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 1, n. 1, p. 27-42, 2004.

ALMEIDA, L. P. **Caracterização de pigmentos da *Curcuma longa*, avaliação da atividade antimicrobiana e morfogênese in vitro na produção de pigmentos curcuminoides e óleos essenciais**. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) Universidade federal de Minas Gerais, 2006.

ALMEIDA ISSA, M. C.; MANELA-AZULAY, M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v. 85, n.4, p. 501-511, Julho – Agosto, 2010.

AMARAL, R.R. et al. Terapia fotodinâmica na endodontia: revisão de literatura. **Revista da Faculdade de Odontologia - Universidade de Passo Fundo(UPF)**, v. 15, n. 2, p. 207-211, 2010.

ARAÚJO, N.C.; MENEZES, R.F.D; CARNEIRO, v. s. m; et al. Photodynamic Inactivation of Cariogenic Pathogens Using Curcumin as Photosensitizer. **Photodmedicine and Laser Surgery**, v. 20, n. 20, p. 1-5, 2016.

AYDEMIR, E. H. Acne vulgaris. **Turkish Archives of Pediatrics/ Türk Pediatri Arşivi**, v. 49, n. 1, p. 13, 2014.

BARAKAT, M. T. et al. Significant reduction of inflammation and sebaceous glands size in acne vulgaris lesions after intense pulsed light treatment. **Dermatologic Therapy**, v. 30, n. 1.p. 1-5, 2016.

BETTOLI, V.; ZAULI, S.; VIRGILI, A. Is hormonal treatment still an option in acne today? **British Journal of Dermatology**, v. 172, n. S1, p. 37-46, 2015.

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

BOEN,M; BROWNELL, J. PATEL, P; TSOUKAS, M.M. The Role of Photodynamic Therapy in Acne: An Evidence-Based Review. **American Journal of Clinical Dermatology**, v.18, n.3, p. 311-321, Março, 2017.

BRENNER, F.M.; ROSAS, F.M.B.; SULZBACH, M.L.; CARVALHO, V.G. Acne: um tratamento para cada paciente. **Revista Ciências Médicas**, Campinas, v.15, p. 257-266, 2006.

BROWNELL, J.; WANG, S.; TSOUKAS, Maria M. Phototherapy in Cosmetic Dermatology. **Clinics in Dermatology**, v. 34, n. 5, p. 623-627, 2016.

BRUZELL, E.M.; MORISBAK, E.; TONNESEN, H.H. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 4, p. 523-530, 2005.

BURKHART, C. G.; BURKHART, C. N. Expanding the microcomedone theory and acne therapeutics: *Propionibacterium acnes* biofilm produces biological glue that holds corneocytes together to form plug. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 57, p.722-724, 2007

CARDOSO, B.C. **Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade do Minho, Porto, 2004.

CARNEIRO, V. S. M.; CATÃO, M. H. C. V. Aplicações da terapia fotodinâmica na odontologia. **Revista da Faculdade de Odontologia de Lins**, v. 22, n. 1, p. 25-32, 2012.

CASTRO, D.T. **Efeito da incorporação de vanadato de prata nano estruturado na atividade antimicrobiana, propriedades mecânicas e morfologia de resinas acrílicas**. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) Universidade de São Paulo, 2014.

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

CHEN, Mei-Jou., *et al.* High sérumdehydroepiandrosterone sulfate is associated with phenotypic acne and a reduced risk of abdominal obesity in women with polycystic ovary syndrome. **Human Reproduction**, v. 26, n. 1, p.227–34, 2011.

CIEPLIK, F. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–4, 2014.

COATES, P. *et al.* Prevalence of antibiotic-resistant *Propionibacteria* on the skin of acne patients: 10-year surveillance data and snapshot distribution study. **British Journal of Dermatology**, v.5, n.146, p. 840-848, 2002.

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

CULLER, H.F. Formação de biofilme por *Escherichia coli* enteropatogênica atípica. **Dissertação de Mestrado** (Biotecnologia) Universidade de São Paulo, 2010.

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

DAI, T. *et al.* Blue light for infectious diseases: *Propionibacterium acnes*, *Helicobacter pylori*, and beyond? **Drug Resistance Updates**, v. 15, n. 4, p. 223-236, 2012.

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

DOLMANS, D. E.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic Therapy for Cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 375–80, 2003.

DESSINIOTI M. D.; KATSAMBAS, A. D. Propionibacterium acnes and antimicrobial resistance in acne. **Clinics in Dermatology**, v. 35, n. 2, p. 163-167, 2016.

DESSINIOTI, C.; ANTONIOU, C.; KATSAMBAS, A. Acne form eruptions. **Clinics in dermatology**, v. 32, n. 1, p. 24-34, 2014.

DESSINIOTI, C.; KATSAMBAS, A. D. The role of *Propionibacterium acnes* in acne pathogenesis: facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 1, p. 2-7, 2010.

DI LANDRO, A. *et al.* Family history, body mass index, selected dietary factors, menstrual history, and risk of moderate to severe acne in adolescents and young adults. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 67, n. 6, p. 1129-1135, 2012.

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

DOVIGO, L.N., PAVARINA, A.C.; RIBEIRO, A.P.D.; BRUNETTI, I.L.; COSTA, C.A.S; JACOMASSI, D.P.; BAGNATO, V.S.; KURACHI, C. Investigation of Photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, p. 895-903, 2011.

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

DRÉNO, B. *et al.* Adult female acne: a new paradigm. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 27, n. 9, p. 1063-1070, 2013.

FALCOCCHIO, S. *et al.* *Propionibacterium acnes* GehA lipase, an enzyme involved in acne development, can be successfully inhibited by defined natural substances. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 40, n. 3-4, p. 132-137, 2006.

FERREIRA, Daniela Maranhão. **Estudos de sistemas nanocarreadores para o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) e seu éster derivado (8-ALA) aplicados na Eletroquimioterapia e Terapia Fotodinâmica contra o câncer de pele**. 2012. 93f. Tese (Doutorado em Medicamentos e Cosméticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

FERREIRA, Lurdiano Osório *et al.* Efeitos Colaterais associados ao uso de Esteroides Anabolizantes Andrógenos Auto Relatados por Praticantes de Musculação do sexo Masculino. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 18, p. 35-42, 2014.

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

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

GOLD, M.H. Acne and PDT: new techniques with lasers and light sources. **Lasers in Medical Science**, v. 22, p.67-72, 2007.

GOLLNICK, H. P. M. From new findings in acne pathogenesis to new approaches in treatment. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 29, n. S5, p. 1-7, 2015.

GOODMAN, G. J. Post acne scarring: A review of its pathophysiology and treatment. **Dermatologic Surgery**, v. 26, n.9, p. 857-871, 2000.

GOULART, R.C; BOLEAN, M.; PAULINO, T.P.; THEDEI, G.; SOUZA, S.L.; TEDESCO, A.C. *et al.*, Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Photomedicine Laser Surgery**, v. 28, n.1, p.53-60, 2010.

HALVORSEN, J. A. *et al.* Suicidal Ideation, Mental Health Problems, and Social Impairment Are Increased in Adolescents with Acne: A Population-Based Study. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 2, p. 363-370, 2011.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436-450, 2004.

HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 33, p. 67-73, 2016.

HARPER, J. C. Use of Oral Contraceptives for Management of Acne Vulgaris: Practical Considerations in Real World Practice. **Dermatologic Clinics**, v. 34, n. 2, p. 159-165, 2016.

HAUKVIK, T.; BRUZELL, E.; KRISTENSEN, S.; TONNESEN, H.H. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. **Pharmazie**, v. 64, p. 666-673, 2009.

HONGCHARU, W. *et al.* Topical ALA-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 2, p. 183-192, 2000.

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

JEON, Y. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy using chlorin e6 with halogen light for acne bacteria-induced inflammation. **Life Sciences**, v. 124 p. 56-63, 2015

JUARRANZ, Á. *et al.* Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. **Clinical and Translational Oncology**, v. 10, n. 3, p. 148-154, 2008.

KHARKWAL, G. B. *et al.* Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, n. 7, p. 755–767, 2011.

KASHEF, N.; AKBARIZARE, M.; RAZZAGHI, M. R. In vitro Activity of Linezolid in Combination with Photodynamic Inactivation Against *Staphylococcus aureus* Biofilms. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v.9, n.1, p. 44-48, 2017.

KEMPIAK, S. J.; UEBELHOER, N. Superficial chemical peels and microdermabrasion for acne vulgaris. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 27, n.3, p. 212-220, 2008.

KIM, R. H.; ARMSTRONG, A. W. Current state of acne treatment: Highlighting lasers, photodynamic therapy, and chemical peels. **Dermatology Online Journal**, v.17, n.3, p.1-8, 2011.

LAMBERT, L. Acne: review. **South African Family Practice**, v. 57, n. 6, p. 16-20, 2015.

LEYDEN, J.J.; DEL ROSSO, J.Q.; BAUM, E.W. The use of Isotretinoin in the treatment of acne vulgaris: Clinical Considerations and future directions. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v.7, n.2, p. 3-21, 2014.

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

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

MEI, X.; SHI, W.; PIAO, Y. Effectiveness of photodynamic therapy with topical 5-aminolevulinic acid and intense pulsed light in Chinese acne vulgaris patients.

Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine, v. 29, n. 2, p. 90-96, 2013.

MELNIK B. Isotretinoin and FoxO1: A scientific hypothesis. **Dermato-endocrinology**, v.3, n.3, p.141-165, 2011

MIQUEL, J; BERND, A; SEMPERE, JM; DÍAZ-ALPERI, J; RAMÍREZ, A
The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 34, n.1, p. 37-46, 2002.

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

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

NAJAFI, S. *et al.* An In Vitro Comparison of Antimicrobial Effects of Curcumin-Based Photodynamic Therapy and Chlorhexidine, on Aggregatibacter actinomycetemcomitans. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, n.7, v.1, p. 21-25, 2016

NAKASE, K.; NAKAMINAMI, H.; NOGUCHI, N.; NISHIJIMA, S. SASATSU. M.
First report of high levels of clindamycin-resistant *Propionibacterium acnes* carrying in Japanese patients with acne vulgaris. **Journal of Dermatology**, v. 9, n. 39, p. 794-796, 2012.

NESTOR, M. S. The use of photodynamic therapy for treatment of acne vulgaris. **Dermatologic Clinics**, v. 25, n. 1, p. 47, 2007.

NUMATA, S.*et al.* Analysis of facial skin-resident microbiota in Japanese acne patients. **Dermatology**, v. 228, n. 1, p. 86-92, 2013.

OPRICA C., *et al.* Antibiotic resistant *Propionibacterium acnes* on the skin of patients with moderate to severe acne in Stockholm. **Anaerobe**, n. 10, v.3, p. 155-164, 2004.

PARTH, S.; ACHARYA, N.; ROHAN, L. ; SRINIVASAN S. Acne Vulgaris: An Update on Current Therapy and Advances in Treatment Strategies. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 40, n.1, p. 234-244, 2016.

PATRICK, G. L.; An Introduction to Medicinal Chemistry, Oxford University Press: New York, cap. 16, 2005.

PEI, S. *et al.* Light-based therapies in acne treatment. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 6, n. 3, p. 145, 2015.

PELCZAR, M. J. Microbiologia conceitos e aplicações. 2º. São Paulo: 1997.

PEETERS *et al.*, Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72 p. 157–165, 2008.

QUINTERO, Y. *et al.* *Propionibacterium acnes*: pasado, presente y futuro. **Dermatología Venezolana**, v. 53, n. 2, 2015.

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

RIBAS, J.; OLIVEIRA, C.M.P.B. Acne vulgaris and well-being in medical students. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 83, n. 6, 2008.

RIBEIRO, B.M. *et al.* Etiopatogenia da acne vulgar: uma revisão prática para o dia a dia do consultório de dermatologia. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 7, n. 3, p. 20-26, 2015.

RONQUI, M. R; COLETTI, T. M. S. F. A., DE FREITAS, L. M. *et al.* Synergistic antimicrobial effect of photodynamic therapy and ciprofloxacin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 158, p. 122-129, 2016

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

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

SIBATA, C. H. *et al.* Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 8, p. 869-880, 2000.

SOCRANSKY, S.; HAFFAJEE, A. D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontology**, v. 28, p. 12-55, 2002.

TAN, J.*et al.* Oral Isotretinoin: New Developments Relevant to Clinical Practice. **Dermatologic Clinics**, v. 34, n. 2, p. 175-184, 2016.

TARASZKIEWICZ, A.; FILA, G. GRINHOLC M., NAKONIECZNA J. Innovative strategies to overcome biofilm resistance. **Biomed Research International**, 2013.

THIBOUTOT, D. *et al.* New insights into the management of acne: an update from the Global Alliance to Improve Outcomes in Acne group. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 60, n. 5, p. S1-S50, 2009.

TONON, C.C. *et al.* Comparative effects of photodynamic therapy mediated by curcumin on standard and clinical isolate of *Streptococcus mutans*. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v.1, n. 16, p. 1-6, 2015.

TOREZAN, L. *et al.* Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 445-459, 2009.

WAN, M. T.; LIN, J. Y. Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. **Clinical Comestic and Investigation Dermatology**, v.7, p. 145-163, 2014.

WANG, X. L. *et al.* Topical ALA PDT for the treatment of severe acne vulgaris. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 1, p. 33-38, 2010.

WELL, D. Acne vulgaris: A review of causes and treatment options. **The Nurse Practitioner**, v. 38, n. 10, p. 22-31, 2013.

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

YANG, Y. S. *et al.* Cigarette smoke-induced interleukin-1 alpha may be involved in the pathogenesis of adult acne. **Annals of Dermatology**, v. 26, n. 1, p. 11-16, 2014.

YIN, R. *et al.* Investigation of optimal aminolaevulinic acid concentration applied in topical aminolaevulinic acid-photodynamic therapy for treatment of moderate to severe acne: a pilot study in Chinese subjects. **British Journal of Dermatology**, v.163, n. 5, p. 1064-1071, 2010.

VON NUSSBAUM, F.; BRANDS, M.; HINZEN, B.; WEIGAND, S.; HABICH, D. **Angewandte Chemie International Edition**, 2006.

ZAENGLEIN, A. L. *et al.* Guidelines of care for the management of acne vulgaris. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 5, p. 945-973, 2016

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

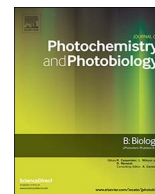
CAPÍTULO II

Artigo aceito e publicado:

“Susceptibility of *Enterococcus faecalis* and *Propionibacterium acnes* to antimicrobial photodynamic therapy”

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology – ISSN: 1011-1344

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.11.035>



Susceptibility of *Enterococcus faecalis* and *Propionibacterium acnes* to antimicrobial photodynamic therapy

Sarah Raquel de Annunzio^{a,1}, Laura Marise de Freitas^{a,1}, Ana Lígia Blanco^a,
Mardoqueu Martins da Costa^b, Christian C. Carmona-Vargas^c, Kleber Thiago de Oliveira^c,
Carla Raquel Fontana^{a,*}

^a Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara. Rodovia Araraquara-Jaú, Km1, Campus Ville, Araraquara, SP, CEP 14800-903, Brazil

^b Universidade Brasil (UniBrasil), Departamento de Engenharia Biomédica, Rua Carolina Fonseca, 235, Vila Santana, São Paulo, SP CEP: 08230-030, Brazil

^c Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Departamento de Química, Laboratório de Química Bioorgânica, Rodovia Washington Luís, Km 235 - SP-310, São Carlos, SP, CEP 13565-905, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Antimicrobial photodynamic therapy
Enterococcus faecalis
Propionibacterium acnes
Methylene blue
Chlorin-e6
Curcumin

ABSTRACT

Bacterial resistance to available antibiotics nowadays is a global threat leading researchers around the world to study new treatment modalities for infections. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has been considered an effective and promising therapeutic alternative in this scenario. Briefly, this therapy is based on the activation of a non-toxic photosensitizing agent, known as photosensitizer (PS), by light at a specific wavelength generating cytotoxic singlet oxygen and free radicals. Virtually all studies related to aPDT involve a huge screening to identify ideal PS concentration and light dose combinations, a laborious and time-consuming process that is hardly disclosed in the literature. Herein, we describe an antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) study against *Enterococcus faecalis* and *Propionibacterium acnes* employing methylene blue, chlorin-e6 or curcumin as PS. Similarities and discrepancies between the two bacterial species were pointed out in an attempt to speed up and facilitate futures studies against those clinical relevant strains. Susceptibility tests were performed by the broth microdilution method. Our results demonstrate that aPDT mediated by the three above-mentioned PS was effective in eliminating both gram-positive bacteria, although *P. acnes* showed remarkably higher susceptibility to aPDT when compared to *E. faecalis*. PS uptake assays revealed that *P. acnes* is 80 times more efficient than *E. faecalis* in internalizing all three PS molecules. Our results evidence that the cell wall structure is not a limiting feature when predicting bacterial susceptibility to aPDT treatment.

1. Introduction

Bacterial resistance to available antibiotics and the low perspective related to the discovery of new drugs have lead researchers to search for alternative antimicrobial treatment [1], and photodynamic therapy (PDT) is among the alternatives. PDT is a treatment modality based on the interaction of three fundamental components: a photosensitizer (PS), visible light and oxygen [2,3]. When the PS is excited by the light it can interact with the surroundings through two pathways, named type I and type II reactions. Type I reaction takes place when the PS in its excited triplet state transfers charges (e^- or H^+) to biomolecules, to originate radical species. In the type II reaction, the triplet excited state PS transfers energy directly to the ground-state triplet oxygen, in a phenomenon named triplet-triplet annihilation, leading to the

formation of the highly reactive and cytotoxic singlet oxygen. Both reactions take place at the same time and the relation between the two processes depends on the PS, the oxygen and substrates concentrations, and the bond-affinity of PS with the substrates [4–7].

Photosensitizers are molecules that possess the ability to absorb light in specific wavelengths and use the energy to trigger photo-oxidative reactions in the presence of molecular oxygen [2,8]. An efficient PS must present no toxicity in the absence of light activation, selective uptake by the target cell, and generate high amounts of reactive oxygen species (ROS), among other properties [9]. In the past few years, different PSs have been studied in PDT. Curcumin (CUR), methylene blue (MB), and chlorin-e6 (Ce6) are examples of molecules with well-established photosensitizing properties, which are being widely employed in studies involving this treatment modality [10–14], and were the PS

* Corresponding author.

E-mail addresses: mardoqueu.costa@universidadebrasil.edu.br (M.M. da Costa), kleber.oliveira@ufscar.br (K.T. de Oliveira), fontanacr@fcar.unesp.br (C.R. Fontana).

¹ These authors contributed equally to this work.