



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
Doutorado - programa em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Sarah Raquel De Annunzio

**Avaliação da terapia fotodinâmica contra biofilmes acneicos
polimicrobianos: um estudo pré-clínico**

Araraquara

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
Doutorado - programa em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Sarah Raquel De Annunzio

**Avaliação da terapia fotodinâmica contra biofilmes acneicos
polimicrobianos: um estudo pré-clínico**

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

Orientadora: Dra. Carla Raquel Fontana

Coorientadora: Dra. Juliana Cabrini Carmello

Araraquara

2022

D278a De Annunzio, Sarah Raquel.
Avaliação da terapia fotodinâmica contra biofilmes acneicos polimicrobianos: um estudo pré-clínico / Sarah Raquel De Annunzio. – Araraquara: [S.n.], 2022.
112 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Carla Raquel Fontana.
Coorientadora: Juliana Cabrini Carmello.

1. Biofilmes polimicrobianos. 2. Terapia fotodinâmica. 3. Cutibacterium acnes. 4. Acne vulgar. 5. Curcumina. 6. Azul de metileno. 7. Clorina-e6. I. Fontana, Carla Raquel, orient. II. Carmello, Juliana Cabrini, coorient. III. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Avaliação da terapia fotodinâmica contra biofilmes acneicos polimicrobianos: um estudo pré-clínico

AUTORA: SARAH RAQUEL DE ANNUNZIO

ORIENTADORA: CARLA RAQUEL FONTANA MENDONÇA

COORIENTADORA: JULIANA CABRINI CARMELLO

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

Profa. Dra. CARLA RAQUEL FONTANA MENDONÇA (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacéuticas UNESP Araraquara

Profa. Dra. ILANA LOPES BARATELLA DA CUNHA CAMARGO (Participação Virtual)
Instituto de Física de São Carlos - USP

Profa. Dra. ANA CLAUDIA PAVARINA (Participação Virtual)
Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese / Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Profa. Dra. PAULA ABOUD BARBUGLI (Participação Virtual)
Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese / Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Araraquara, 25 de maio de 2022

Dedico esse trabalho ao meu pai Almir Agostinho De Annunzio (in memoriam) por nunca ter medido esforços para que eu pudesse estudar.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me dar forças e serenidade em todos os momentos e por ter colocado em meu caminho tantas pessoas boas.

Aos meus **pais, Almir Agostinho De Annunzio** (in memoriam) e **Maria Raquel Ribola** por muitas vezes abrirem mão dos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. O amor, apoio e incentivo de vocês foram fundamentais para que esse trabalho fosse realizado. Minha eterna gratidão e amor por tudo o que fizeram por mim. Essa conquista é nossa!

Ao meu **irmão Renato Augusto De Annunzio**, que esteve presente e disponível em todos os momentos, sempre me ajudando de forma carinhosa e animando nos momentos difíceis. Eu não poderia ter irmão melhor. Minha eterna gratidão e amor por tudo!

A minha tia **Elza Ribola** por toda ajuda e incentivo em todos os momentos.

A minha orientadora **Carla Fontana**, por ter aceitado me orientar durante os cursos de mestrado e doutorado, pela confiança, amizade, cuidado, por todos os ensinamentos compartilhados, pela paciência e compreensão nos momentos difíceis e por me oferecer tantas oportunidades de colaborar com outros grupos, fazendo com que eu pudesse me desenvolver ainda mais profissionalmente e pessoalmente. O meu eterno carinho, respeito, gratidão e admiração por você, Carla! Não apenas por ser essa profissional incrível, mas por ser essa mulher forte, generosa e humilde, que inspira as pessoas que convivem com você a serem melhores a cada dia! Sou verdadeiramente grata por ter tido a oportunidade de trabalhar com você durante todos esses anos.

A minha coorientadora **Juliana Carmello**, pela confiança, incentivo, por auxiliar na elaboração do projeto e coorientar esse trabalho.

A professora **Paula Barbugli**, pela confiança, incentivo e por compartilhar comigo tanto conhecimento. Por me ajudar no delineamento e execução dos experimentos de biologia celular e microbiologia, nos ensaios de microscopia de fluorescência confocal e nas discussões científicas,

sempre de forma paciente, gentil e humilde. A sua ajuda e parceria foram fundamentais e contribuíram imensamente para o desenvolvimento dessa tese, Paula. Aprendi demais com você! Espero que um dia eu possa retribuir toda a ajuda que você me ofereceu. Minha eterna gratidão, carinho, respeito e admiração por você e pelo seu trabalho!

A professora **Ana Cláudia Pavarina**, pela confiança, incentivo, parceria e todos os ensinamentos compartilhados ao longo desses anos, sempre de forma generosa, paciente e humilde. Espero que um dia eu possa retribuir toda a ajuda que a senhora me ofereceu. Minha eterna gratidão, carinho, respeito e admiração por você e pelo seu trabalho! Sua parceria e colaboração foram fundamentais para a realização dessa tese!

A amiga **Cláudia Jordão**, por ter aceitado o desafio de colaborar com esse trabalho e compartilhado comigo todo o seu conhecimento em biologia molecular, me ajudando em todos os experimentos com muita paciência e generosidade. Não há palavras que expressem toda minha gratidão por você, Cláudia. Sua ajuda e amizade foram fundamentais e contribuíram demais para a realização desse estudo. Aprendi muito com você e te admiro muito como ser humano e profissional. Minha eterna gratidão, carinho e respeito por você. Espero um dia poder retribuir toda a ajuda que você me ofereceu!

Ao amigo **Freddy Dett**, por todos os ensinamentos, discussões científicas e ajuda no laboratório de biologia celular. Sempre ensinando a todos de forma paciente, gentil. Minha eterna gratidão e carinho por você, Freddy!

A **Alessandra Sant'Ana** pela disponibilidade e por auxiliar na coleta das amostras clínicas sempre de forma paciente, solícita e carinhosa! Sua ajuda e parceria foram fundamentais para a realização desse estudo.

A técnica do laboratório de biofotônica **Elaine Toscano**, por compartilhar comigo todo o seu conhecimento em microbiologia clínica, pela amizade e disponibilidade em me ajudar nos momentos em que precisei.

Aos **professores do programa de Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia** por todo o conhecimento compartilhado durante os cursos de mestrado e doutorado.

Aos professores do departamento de prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr), **Marlise Klein, Janaína Jorge, Ewerton Mima e Carlos Eduardo Vergani**, por toda a ajuda e conhecimentos compartilhados ao longo desses anos e por disponibilizarem os laboratórios para que eu pudesse realizar os experimentos.

A professora **Livia Dovigo**, por sempre estar disponível para sanar minhas dúvidas. Sou muito grata por toda ajuda, incentivo e conhecimentos compartilhados ao longo desses anos. Minha eterna gratidão, carinho e respeito por você.

Ao professor **Kleber Oliveira**, pela parceria, contribuição e disponibilidade ao longo desses anos de colaboração.

Ao professor **Fernando Primo** e a aluna **Camila Amantino**, por terem cedido as células de fibroblastos para a realização dos ensaios.

Ao amigo **Lucas Zago** por estar sempre presente em minha vida, me ajudando, acalmando nos momentos difíceis e compartilhando conhecimento.

Ao amigo **Willian Santana** por estar sempre presente, pela amizade, conselhos, troca de conhecimentos científicos, parceria e pelos momentos de diversão compartilhados ao longo de todos esses anos.

Aos amigos do laboratório de biofotônica, **Amanda Koberstain, Felipe Pereira, Pedro Lopes e Vinícius Medeiros!** Sou muito grata por ter tido a oportunidade de trabalhar com pessoas tão especiais como vocês!

Aos amigos, **Analu Oliveira, Túlio Ferisse, e Camila Tasso** por todo conhecimento acadêmico compartilhado, pela amizade, apoio, incentivo e por me ajudarem nos momentos difíceis.

À **Marta Pereira, Érica de Ávila e Luana Dias**, pelo conhecimento compartilhado e por toda ajuda na rotina do laboratório de biologia celular.

À **Daniela Tita**, por estar sempre disponível e me auxiliar de forma generosa e paciente em todo o processo de submissão do trabalho ao comitê de ética.

A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR), em especial às meninas da seção técnica de pós graduação: **Cláudia Molina**, **Aniele Vilella** e **Denise Hatanaka**, por serem sempre tão gentis e solícitas.

Ao professor **Vanderlei Bagnato** e ao CEPOF processo FAPESP nº 2013/07276-1.

Processo nº 2018/09088-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

“É justo que muito custe o que muito vale.”

Santa Teresa d' Ávila

RESUMO

A acne vulgar é uma das doenças dermatológicas mais comuns encontradas na prática clínica. As opções de tratamento para esta dermatose são diversas, porém nem sempre são efetivas. A resistência microbiana frente aos antibióticos e os efeitos adversos das terapias convencionais têm feito pesquisadores investigarem tratamentos alternativos. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo avaliar a ação da terapia fotodinâmica (TFD) mediada por curcumina, azul de metileno e clorina-e6 sobre biofilmes de bactérias provenientes de pacientes com acne vulgar. Foram realizadas de uma a quatro aplicações fotodinâmicas nos biofilmes e a identificação dos microrganismos presentes nas amostras foi realizada por PCR convencional, por amplificação de genes com *primers* espécie-específicos. A biocompatibilidade dos tratamentos foi avaliada em um modelo de co-cultura em três dimensões (3D) de pele. Os microrganismos identificados nas amostras clínicas foram *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados mostraram que a TFD mediada por azul de metileno foi capaz de eliminar completamente as células dos biofilmes acneicos após três aplicações, enquanto que a TFD mediada por curcumina e clorina-e6, embora tenham apresentado reduções significativas, não eliminaram totalmente as células dos biofilmes, mesmo após quatro aplicações fotodinâmicas. Dessa forma, o sucesso das aplicações consecutivas pode ser dependente do fotossensibilizador. Os ensaios de biocompatibilidade mostraram que a TFD mediada pelos três fotossensibilizadores reduziram significativamente a viabilidade das células no modelo de cultivo 3D de pele e esse efeito pode ser dependente da fluência utilizada. Tomados em conjunto, os resultados obtidos nesse estudo revelaram que os três fotossensibilizadores estudados podem ser promissores para o desenvolvimento de protocolos clínicos eficientes no tratamento da acne vulgar.

Palavras-chave: biofilmes polimicrobianos; terapia fotodinâmica; *Cutibacterium acnes*; acne vulgar; curcumina, azul de metileno; clorina-e6.

ABSTRACT

Acne vulgaris is one of the most common dermatological diseases encountered in clinical practice. The treatment options for this dermatosis are diverse, but they are not always effective. Microbial resistance to antibiotics and the adverse effects of conventional therapies have led researchers to investigate alternative treatments. Thus, this study aimed to evaluate the action of photodynamic therapy (PDT) mediated by curcumin, methylene blue and chlorin-e6 on bacterial biofilms from patients with acne vulgaris. One to four photodynamic applications were performed on the biofilms and the identification of microorganisms present in the samples was performed by conventional PCR, by gene amplification with species-specific *primers*. The biocompatibility of the treatments was evaluated in a three-dimensional (3D) skin co-culture model. The microorganisms identified in the clinical samples were *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. The results showed that PDT mediated by methylene blue was able to completely eliminate cells from acne biofilms after three applications, while PDT mediated by curcumin and chlorin-e6, although they showed significant reductions, did not completely eliminate cells from biofilms even after four photodynamic applications. Thus, the success of consecutive applications may be dependent on the photosensitizer. Biocompatibility assays showed that PDT mediated by the three photosensitizers significantly reduced cell viability in the 3D skin culture model and this effect may be dependent on the fluence used. Taken together, the results obtained in this study revealed that the three photosensitizers studied may be promising for the development of efficient clinical protocols in the treatment of acne vulgaris.

Keywords: polymicrobial biofilms; photodynamic therapy; *Cutibacterium acnes*; acne vulgaris; curcumin, methylene blue; chlorin-e6.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACS	do inglês <i>Antioxidant Carrier Sensitizer</i> ACS
ALA	Ácido 5-aminolevulínico
AM	Azul de metileno
ANOVA	Análise de Variância
CE6	Clorina-e6
COCs	Contraceptivos orais combinados
CUR	Curcumina
DNA	do inglês <i>Desoxyribonucleic acid</i>
D.O.	Densidade ótica
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FS	Fotossensibilizador
PI	do inglês <i>Propidium Iodide</i>
L	Luz
LED	do inglês <i>Light Emitting Diodes</i>
Log ₁₀	Logarítimo na base 10
MAL	Aminolevulinato de metila
MFC	Microscopia de Fluorescência Confocal
Ns	Não significativo
N	Número amostral
PBS	Salina tamponada com fosfato

PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PPIX	Protoporfirina IX
T.E	Tris e EDTA
TAE	Tris-Acetate e Na ₂ EDTA
TSB	do inglês <i>Tryptic Soy Broth</i>
TFD	Terapia fotodinâmica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de Jablonski.....	23
Figura 2. Estrutura molecular do azul de metileno.....	25
Figura 3. Estrutura molecular da clorina-e6.....	26
Figura 4. Estrutura molecular da curcumina.....	27
Figura 5. Imagem representativa das fontes de luz utilizadas no estudo (LED 460 e 660 nm).....	38
Figura 6: Produtos de PCR visualizados em gel de agarose.....	53
Figura 7. Viabilidade celular dos biofilmes analisados por Microscopia de fluorescência confocal.....	55
Figura 8: Avaliação da cinética de fotodegradação da curcumina.....	57
Figura 9: Avaliação da cinética de fotodegradação do azul de metileno.....	58
Figura 10: Avaliação da cinética de fotodegradação da clorina-e6.....	59
Figura 11. Internalização da curcumina (75 µg/mL) nos tempos de pré-irradiação de 1,5, 10, 15 e 30 minutos.....	62
Figura 12. Internalização do azul de metileno (75 µg/mL) nos tempos de pré-irradiação de 1,5, 10, 15 e 30 minutos.....	63
Figura 13: Internalização da clorina-6 (75 µg/mL) nos tempos de pré-irradiação de 1, 5, 10, 15 e 30 minutos.....	64
Figura 14. Quantificação da emissão de fluorescência da curcumina.....	65
Figura 15. Quantificação da emissão de fluorescência do azul de metileno.....	65
Figura 16. Quantificação da emissão de fluorescência da clorina-e6.....	66
Figura 17. Análise de unidades formadoras de colônias após irradiação com diferentes fluências de Led 460 nm.....	67
Figura 18. Análise de unidades formadoras de colônias após diferentes fluências Led 660 nm.....	67
Figura 19. Análise de unidades formadoras após aplicação de TFD mediada por curcumina.....	69
Figura 20. Análise de unidades formadoras de colônias após tratamento com a curcumina no escuro.....	70

Figura 21. Análise de unidades formadoras de colônias após aplicação de TFD mediada por azul de metileno.....	71
Figura 22. Análise de unidades formadoras de colônias após tratamento com azul de metileno no escuro.....	71
Figura 23. Análise de unidades formadoras de colônias após aplicação de TFD mediada por clorina-e6.....	72
Figura 24. Análise de unidades formadoras de colônias após tratamento de clorina-e6 no escuro.....	72
Figura 25. Análise de unidades formadoras de colônias após uma aplicação de TFD mediada por curcumina.....	74
Figura 26. Análise de unidades formadoras de colônias após duas aplicações de TFD mediada por curcumina.....	75
Figura 27. Análise de unidades formadoras de colônias após três aplicações de TFD mediada por curcumina.....	75
Figura 28. Análise de unidades formadoras de colônias após quatro aplicações de TFD mediada por curcumina.....	76
Figura 29. Análise de unidades formadoras de colônias após uma aplicação de TFD mediada por azul de metileno.....	77
Figura 30. Análise de unidades formadoras de colônias após duas aplicações de TFD mediada por azul de metileno.....	77
Figura 31. Análise de unidades formadoras de colônias após três aplicações de TFD mediada por azul de metileno.....	78
Figura 32. Análise de unidades formadoras de colônias após uma aplicação de TFD mediada por clorina-e6.....	79
Figura 33. Análise de unidades formadoras de colônias após duas aplicações de TFD mediada por clorina-e6.....	79
Figura 34. Análise de unidades formadoras de colônias após três aplicações de TFD mediada por clorina-e6.....	80
Figura 35. Análise de unidades formadoras de colônias após quatro aplicações de TFD mediada por clorina-e6.....	80

Figura 36. Avaliação do dano nos componentes proteicos da matriz extracelular do biofilme acneico após os tratamentos.....	83
Figura 37. Emissão de fluorescência entre os grupos avaliados.....	84
Figura 38. Emissão de fluorescência entre os grupos avaliados.....	85
Figura 39. Emissão de fluorescência entre os grupos avaliados.....	86
Figura 40. Avaliação da viabilidade celular após tratamento com LED 460 nm e curcumina (50 J/cm ²).....	87
Figura 41. Avaliação da viabilidade celular após tratamento com LED 660 nm e azul de metileno (200 J/cm ²).....	89
Figura 42. Avaliação da viabilidade celular após tratamento com LED 660 nm e azul de metileno (40 J/cm ²).....	90
Figura 43. Avaliação da viabilidade celular após tratamento com LED 660 nm e clorina-e6 (200 J/cm ²).....	91
Figura 44. Análise e caracterização do modelo de pele 3D.....	92
Figura 45. Representação modelo 3D de pele.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Meios específicos utilizados para o crescimento dos microrganismos.....	33
Tabela 2. Descrição da sequência e dos parâmetros dos <i>primers</i> utilizados.....	34
Tabela 3. Componentes e volume de cada reação de PCR.....	35
Tabela 4. Soluções estoque e de trabalho utilizadas nos ensaios de TFD em biofilmes.....	39
Tabela 5. Representação dos resultados dos ensaios de coloração de Gram e identificação bioquímica das amostras clínicas.....	49
Tabela 6. Quantificação do DNA pós-extração das cepas padrão.....	50
Tabela 7. Quantificação do DNA pós-extração das amostras clínicas.....	51
Tabela 8. Volume de T.E utilizado para diluição dos <i>primers</i>	51
Tabela 9. Média das concentrações dos <i>primers</i>	52

Sumário

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Acne Vulgar	20
1.2. Tratamentos Convencionais	21
1.3. Terapia fotodinâmica	22
1.4. Considerações.....	28
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo geral	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. ESTUDO I - Obtenção das amostras clínicas e a identificação dos microrganismos relacionados.....	29
3.1.1. Autorização para obtenção das amostras clínicas	29
3.1.2. Critérios de inclusão e exclusão para seleção dos participantes no presente estudo.....	29
3.1.3. Coleta das amostras clínicas	30
3.1.4. Meios e condições de cultivo	30
3.1.5. Caracterização por coloração de Gram e identificação bioquímica das amostras clínicas.....	31
3.1.5.1. Coloração de Gram.....	31
3.1.5.2. Avaliação da presença da enzima Catalase	32
3.1.5.3. Avaliação da fermentação do manitol	32
3.1.6. Identificação molecular das amostras clínicas	32
3.1.6.1. Extração de DNA	33
3.1.6.2. Preparo dos <i>primers</i>	33
3.1.6.3. PCR convencional	35
3.1.6.4. Eletroforese em gel de agarose	36
3.2. ESTUDO II - Avaliação da efetividade da terapia fotodinâmica em biofilmes polimicrobianos <i>in vitro</i>	37
3.2.1. Desenvolvimento do biofilme maduro	37
3.2.2. Avaliação da viabilidade celular através da Microscopia de fluorescência Confocal	37
3.2.3. Tratamento fotodinâmico.....	38
3.2.3.1. Fotossensibilizadores e fontes de luz	38
3.2.3.2. Parâmetros utilizados nos ensaios de terapia fotodinâmica	39
3.2.3.3. Caracterização fotoquímica e fotofísica dos fotossensibilizadores ..	40

3.2.3.4.	Avaliação da Internalização dos fotossensibilizadores nas amostras de biofilme através da Microscopia de fluorescência Confocal	40
3.2.3.5.	Avaliação da viabilidade celular através da contagem de UFC/mL .	41
3.2.3.6.	Avaliação dos componentes proteicos da matriz do biofilme por meio de Microscopia de Fluorescência Confocal	44
3.3.	ESTUDO III - Avaliação da biocompatibilidade da terapia fotodinâmica sobre um modelo de co-cultura 3D de pele.....	44
3.3.1.	Cultivo celular.....	44
3.3.2.	Desenvolvimento do Modelo de Co-cultura Tridimensional (3D) de pele	45
3.3.3.	Aplicação da terapia fotodinâmica sobre os modelos de Co-cultura Tridimensional (3D) de pele	46
3.3.4.	Viabilidade celular por <i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i> (MTT)	46
3.3.5.	Caracterização e viabilidade celular do modelo de co-cultura 3D de pele por meio de Microscopia de fluorescência confocal	47
3.4.	Análise Estatística	48
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1.	ESTUDO I.....	48
4.1.1.	Caracterização por coloração de Gram e identificação bioquímica das amostras clínicas.....	48
4.1.2.	Identificação molecular das amostras clínicas	50
4.1.3.	Quantificação do rendimento da extração de DNA	50
4.1.4.	Preparo e quantificação dos <i>primers</i>	51
4.1.5.	Produtos de PCR - Eletroforese em gel de agarose	52
4.2.	ESTUDO II.....	54
4.2.1.	Viabilidade celular por meio da técnica de Microscopia de fluorescência Confocal	54
4.2.2.	Estudo fotofísico e fotoquímico dos fotossensibilizadores	55
4.2.3.	Internalização dos fotossensibilizadores nas amostras de biofilme através da técnica de Microscopia de fluorescência Confocal	59
4.2.4.	Viabilidade celular dos biofilmes polimicrobianos após tratamento fotodinâmico (UFC/mL)	66
4.2.5.	Avaliação da viabilidade das células do biofilme após aplicações consecutivas de terapia fotodinâmica	73
4.2.6.	Avaliação do dano dos componentes proteicos da matriz do biofilme após os tratamentos fotodinâmicos.....	81

4.3. ESTUDO III	86
4.3.1. Viabilidade celular por MTT.....	86
4.3.2. Caracterização e viabilidade celular do modelo de co-cultura 3D de pele por meio de Microscopia de fluorescência confocal	92
5. CONCLUSÕES	94
6. ARTIGOS PUBLICADOS NO PERÍODO:	96
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
8. ANEXOS	109

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acne Vulgar

A acne vulgar, um distúrbio da unidade pilossebácea, é uma das doenças mais comuns, na qual os pacientes buscam atendimento em clínicas dermatológicas (WILLIAMS; DELLAVALLE; GARNER, 2012). A patogênese é multifatorial (PASCHOAL E ISMAEL, 2010), afeta principalmente adolescentes (HABESHIAN E COHEN, 2020), porém ainda é prevalente em um significativo número de adultos, acometendo quase metade das mulheres com idade entre 21 e 30 anos (PERKINS *et al.*, 2012). Afeta 9,4 da população em todo o mundo (TAN E BATHE, 2015; SACHDEVA *et al.*, 2021), podendo deixar cicatrizes permanentes (AKHAVAN; BERSHAD, 2003; FELDMAN *et al.*, 2004).

Embora a doença não cause risco de vida, estudos têm reportado o efeito severo no psicológico dos pacientes acometidos, podendo afetar a sociabilidade, causar fobias, quadros depressivos e em casos extremos, associados a fragilidades psíquicas prévias, levar ao suicídio (COTTERILL; CUNLIFFE, 1997; GUPTA; GUBTA, 1998).

A fisiopatologia da acne envolve alterações de queratinização dentro da unidade pilossebácea, resultando na formação de comedões, o aumento da produção de sebo e a inflamação perifolicular associada à proliferação bacteriana, sendo o *Cutibacterium acnes* (anteriormente conhecido como *Propionibacterium acnes*), o principal agente etiológico relacionado a esta doença (GOLLNICK *et al.*, 2003 a; DEGITZ *et al.*, 2007).

C. acnes é um patógeno Gram-positivo, anaeróbio facultativo, que coloniza os folículos sebáceos. De forma geral, esse microrganismo prevalece em áreas da pele cuja quantidade de folículos sebáceos é maior, visto que, esses folículos oferecem um ambiente propício para essa bactéria, anaeróbio e rico em lipídeos (GOLLNICK, 2003 b). *C. acnes* é capaz de metabolizar os triglicerídeos do sebo em glicerol e ácido graxo, pois produz lipases. Esse processo metabólico por sua vez pode auxiliar no processo inflamatório (MCINTURFF; KIM, 2005).

A associação de *C. acnes* com a acne vulgar já está bem estabelecida na literatura (BEYLOT *et al.*, 2013). Um estudo recente conduzido por Akaza *et al.*, (2016) tem sugerido que outros microrganismos pertencentes à microbiota da pele, como *Staphylococcus* spp. e *Malassezia* spp. podem apresentar relação com essa dermatose, no entanto, o papel desses microrganismos na patogênese da acne ainda é pouco elucidado (NAKATSUJI *et al.*, 2013; NEILL; JUSUF *et al.*, 2020).

Sabe-se que o biofilme é uma comunidade estruturada (TAN *et al.*, 2012), e que *C. acnes* é encontrado nos folículos predominantemente em forma de biofilmes (JAHNS; ALEXEYEV, 2014). Bactérias nestas condições são incorporadas em uma matriz polimérica extracelular auto-produzida, que fornece proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro e a outras adversidades, como por exemplo, a escassez de nutrientes e a antibioticoterapias, elevando dessa forma a resistência aos antibióticos, podendo ser até mil vezes mais resistentes aos antibióticos, comparado às células suspensas (CHOKR *et al.*, 2006; KRISTIAN *et al.*, 2008; MONTANARO *et al.*, 2007).

Por meio de um estudo genômico (BURKHART e BURKART, 2007), o biofilme formado por *C. acnes* foi identificado como um polímero de glicocálix. Esse polímero age como uma “cola” biológica e quando presente no sebo ocasiona a adesão de queratinócitos, dessa forma, podendo contribuir com a formação de comedões. Os autores sugerem que essa substância pode exercer influência sobre a imunogenicidade, curso clínico e impacto na resposta dos tratamentos frente à acne.

1.2. Tratamentos Convencionais

Os tratamentos convencionais da acne disponíveis atualmente consistem do uso de retinóides tópicos (GOLLNICK *et al.*, 2003a), peróxido de benzoíla (WEBSTER; GRABER, 2003), antibióticos tópicos e sistêmicos (FELDMAN *et al.*, 2004) e a isotretinoína (GOLLNICK, 2003b). No entanto, esses medicamentos podem causar irritação na pele e podem levar a baixa adesão dos pacientes, pois requerem o uso diário (BOEN *et al.*, 2017). No caso da acne, o uso de antibióticos pode ser receitado por longos períodos sem

oferecer sucesso nos resultados, além disso, esses fármacos podem ocasionar a resistência dos microrganismos (KATSAMBAS; PAPAKONSTANTINO, 2004), um problema global (DESSINIOTI; KATSAMBAS, 2017).

A isotretinoína apresenta extensos efeitos colaterais e necessita de um monitoramento rigoroso (BOEN *et al.*, 2017). A utilização de contraceptivos orais combinados (COCs) tais como, etinilestradiol/drospirenona, etinilestradiol/norgestimato, etinilestradiol/drospirenona/levomefolato e etinilestradiol/acetato de noretisterona/fumarato ferroso também pode ser indicada para diminuição da produção de sebo em mulheres, pois reduzem a atividade dos hormônios andrógenos (WILLIAMS *et al.*, 2021). No entanto, o tratamento realizado com COCs é restrito a mulheres e o período para gerar resultados efetivos pode variar de seis meses a um ano (TUCHAYI *et al.*, 2015). Na prática clínica também é comum à indicação da extração de comedões, a microdermoabrasão e a realização de peelings químicos, porém, esses procedimentos são considerados tratamentos adjuvantes (FOX *et al.*, 2016; TUCHAYI *et al.*, 2015).

Sendo assim, a busca por novas medidas terapêuticas seguras e eficientes se faz necessária. Nesse contexto a terapia fotodinâmica (TFD) tem sido sugerida como modalidade de tratamento alternativa. Estudos diversos têm demonstrado que a TFD é segura e eficaz para as lesões inflamatórias e não inflamatórias da acne, podendo melhorar significativamente essas lesões (KEYAL; BHATTA; WANG, 2016; WEN; LI; HAMBLIN, 2017; MOY; FROST, MOY, 2020; LI *et al.*, 2021).

1.3. Terapia fotodinâmica

A TFD necessita da presença de três fundamentais elementos para que a reação fotodinâmica aconteça, sendo eles, oxigênio, fotossensibilizador (FS) e luz em um comprimento de onda adequado à faixa de absorção do FS utilizado. Esse FS absorve energia, acarretando a formação de substâncias altamente reativas, as quais danificam a célula-alvo ou microrganismos. Esse processo pode ocorrer de duas formas, o FS no estado tripleto excitado reage com biomoléculas transferindo cargas, dessa forma, dará origem a radicais e íons radicais que reagem com o oxigênio molecular produzindo espécies

reativas de oxigênio, denominada reação tipo I. Quando a transferência de energia acontece de forma direta entre o FS tripleto excitado e o oxigênio em estado tripleto fundamental, ocorre a formação de oxigênio singleto em um processo denominado reação tipo II. Ambas as formas de reação podem causar a morte celular (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; AGOSTINIS *et al.*, 2011; KHARKWAL *et al.*, 2011).

Recentemente Scherer *et al.* (2017) descreveram mecanismos dos tipos III e IV de reações fotodinâmicas, os quais permitem a ocorrência de efeitos citotóxicos em estruturas intracelulares sem a necessidade do oxigênio. Moléculas fotossensíveis do tipo III são geralmente *Antioxidant Carrier Sensitizer* (ACS) que causam a geração eficiente de oxigênio singleto e diminuem a concentração de radicais livres nativos em células malignas. Para o tipo IV, os autores sugerem que seu mecanismo citotóxico está relacionado com FSs que não são capazes de se ligar a um alvo molecular, mas sob excitação leve, um remodelamento intramolecular ocorre através de um processo de fotoisomerização, contribuindo para a ligação da molécula fotossensível à molécula de interesse (Figura 1).

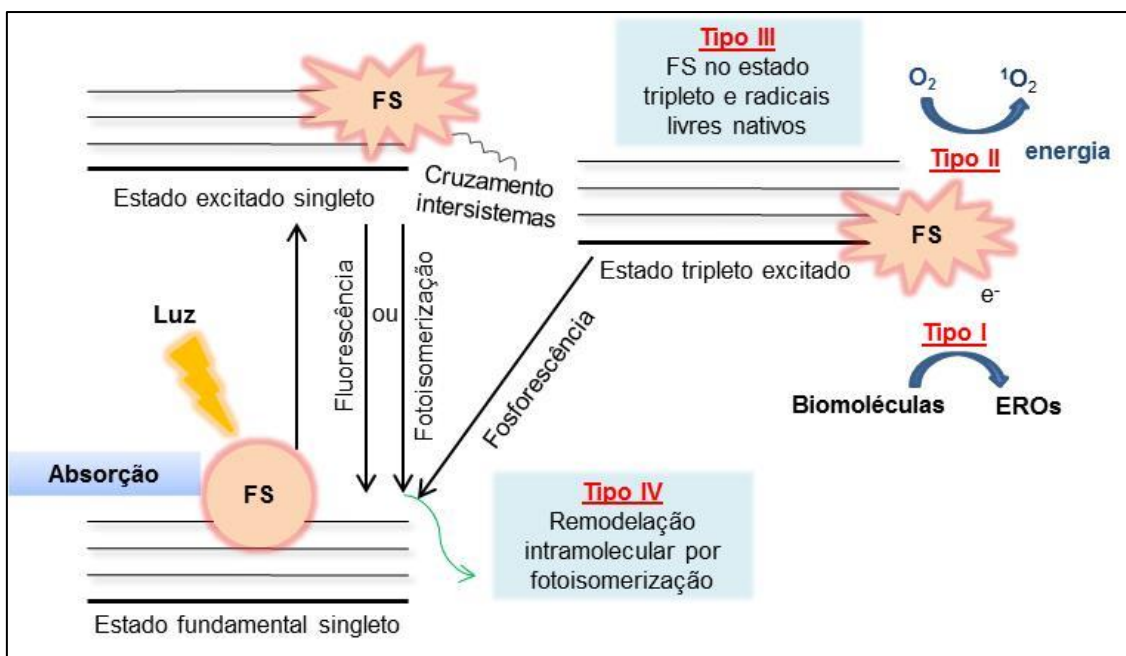


Figura 1. Diagrama de Jablonski representando os mecanismos fotodinâmicos de formação de EROs. FS: fotossensibilizador; EROs: espécies reativas de oxigênio; O₂: oxigênio; ¹O₂: oxigênio singleto. (CALIXTO *et al.*, 2019 modificado).

Devido à ausência de especificidade de alvos das espécies reativas formadas (HENDERSON; DOUGHERTY, 1992), a resistência microbiana frente à TFD é improvável, o que confere vantagem para esta terapia comparada aos tratamentos com antibióticos. O estresse oxidativo ocasionado pela reação fotodinâmica gera danos para as glândulas sebáceas, reduz a viabilidade bacteriana e previne a hiperqueratose (WAN; LIN, 2014).

Quanto aos dispositivos de luz, os lasers e os LEDs (*Light-emitting diode*) têm sido frequentemente utilizados em estudos de TFD visando o tratamento da acne (BOEN *et al.*, 2017). Os sistemas a base de LED possibilitam um maior custo benefício e possibilitam que áreas maiores sejam irradiadas, enquanto que a irradiação do laser é realizada em áreas específicas. Além disso, é importante que as fontes utilizadas em TFD não apresentem efeito térmico (MACHADO 2000; RIBEIRO; SABINO, 2016).

No que se diz respeito aos FSS, os agentes comumente investigados para o tratamento da acne são o ácido 5-aminolevulínico (ALA - LEVULAN®, utilizado clinicamente em pacientes com queratose actínica) e seu éster, aminolevulinato de metila (MAL-METVIX®, utilizado clinicamente em pacientes com queratose actínica, carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular) (TARSTEDT *et al.*, 2016; YEW *et al.*, 2016; PARISER *et al.*, 2016; DE ANNUNZIO *et al.*, 2019). No Brasil, o uso da TFD para pacientes com acne ainda é “*off label*” ou seja, utilizado sem indicação da bula, apenas com base na prescrição clínica, e deve ser indicado em casos precisos (ISSA; BOECHAT; FASSINI, 2016). Recentemente, a ação antimicrobiana da TFD mediada por azul de metileno (AM), clorina-e6 (Ce6) e curcumina (CUR) também tem sido reportada na literatura em estudos *in vitro* (FRADE *et al.*, 2018; DE ANNUNZIO *et al.*, 2018; JEON *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017; RYU; LEE, 2017; DE ANNUNZIO, 2017; YANG *et al.*, 2018).

Por possuir baixo custo, solubilidade em água e etanol, o AM, um derivado fenotiazínico (Figura 2) apresenta banda de absorção na região de 550-700 nm com absorção máxima em 664 nm (JUNQUEIRA *et al.*, 2002), o que possibilita uma maior penetração tecidual, permitindo também aplicações

para o tratamento de lesões mais profundas (TARDIVO *et al.*, 2005; MOREIRA *et al.*, 2012).

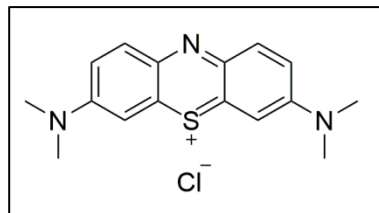


Figura 2. Estrutura molecular do azul de metileno. Fonte: Sampaio *et al.*, (2020).

Em um estudo *in vitro* realizado por Zeina *et al.*, (2001) a redução parcial de suspensões microbianas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium minutissimum*, *Propionibacterium acnes*, *Candida albicans* foi alcançada empregando azul de metileno combinado à luz halógena e adicionalmente a luz solar. Em nosso grupo de pesquisa, uma investigação *in vitro* realizada por De Annunzio *et al.*, (2018) demonstrou uma redução total das suspensões bacterianas de *C. acnes* combinada à irradiação de uma fonte luz LED vermelha (660 nm). Outro estudo realizado por Frade *et al.*, (2018) reportou uma redução parcial do biofilme monoespécie, com uma única aplicação da TFD mediada por azul de metileno e LED (660 nm).

A clorina-e6, pertencente à classe dos derivados da clorofila, apresenta um anel tetrapirrólico que lhe confere características hidrofóbicas e hidrofílicas (Figura 3); a absorção de luz desse FS é em 400 e 660 nm e grandes quantidades de oxigênio singlete são produzidas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Desta forma, a clorina-e6 é considerada promissora para tratamentos sistêmicos e não sistêmicos (GRIMM *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2014; DIOGO *et al.*, 2017).

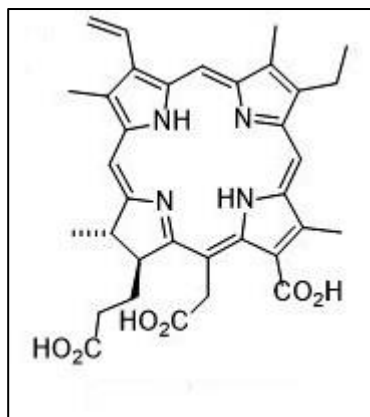


Figura 3. Estrutura molecular da clorina-e6. Fonte: Sampaio *et al.*, (2020).

Um estudo conduzido por Jeon *et al.*, (2015) demonstrou a inativação de várias bactérias da pele, incluindo *C. acnes*, utilizando uma fonte de luz halógena, além disso, relatou que a terapia suprimiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias induzidas por *C. acnes* em um modelo *in vivo*. Nesse mesmo contexto, um estudo conduzido por Wang *et al.*, (2017) relatou que a TFD mediada por clorina-e6 associada a irradiação de luz halógena diminuiu notavelmente a expressão de moléculas inflamatórias *in vitro* e *in vivo*. Da mesma forma, a TFD mediada por esse FS foi capaz de regular a resposta inflamatória de células HaCat expostas a *Staphylococcus epidermidis*. Uma investigação feita por Ryu e Lee, (2017) demonstrou que a TFD mediada por clorina-e6 associada à luz halógena aumentou a produção de colágeno e suprimiu a expressão de metaloproteinases em células HaCaT infectadas com *C. acnes* sugerindo seu potencial uso para melhora das cicatrizes e rejuvenescimento da pele no tratamento da acne.

A curcumina (CUR – Figura 4) é um produto natural fenólico que pode ser obtido sinteticamente ou extraído dos rizomas da planta *Curcuma longa*, insolúvel em água, apresenta uma banda de absorção principalmente na região azul, com um pico em 430 nm. A fotodegradação relativamente rápida da curcumina permite o tratamento de lesões e infecções locais, com a ausência de atividade fotossensível persistente após algumas horas, o que torna esse FS muito estratégico (BRUZELL; MORISBACK; TONNESEN, 2005; DOVIGO *et al.*, 2011a; CIEPLIK *et al.*, 2014).

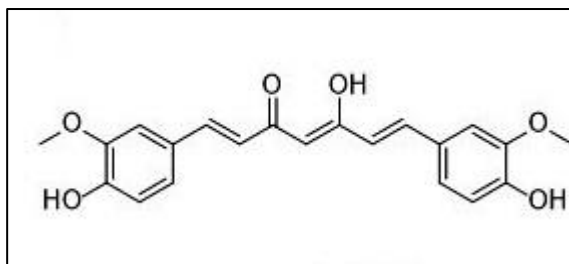


Figura 4. Estrutura molecular da curcumina. Fonte: Sampaio *et al.*, (2020).

A ação fotodinâmica mediada por CUR associada à irradiação LED de 450 nm foi reportada por De Annunzio *et al.*, (2018) alcançando uma redução total das células em suspensões de *C. acnes* empregando baixas concentrações do FS e fluências de luz. De forma semelhante, a associação do LED azul (462 nm) e CUR também foi investigada por Yang *et al.*, (2018) e os autores verificaram 100% de inibição da suspensão de *C. acnes*. Investigações sobre um modelo de biofilme monoespécie de *C. acnes* também foram conduzidas por nosso grupo, possibilitando a inativação microbiana total com apenas uma aplicação da TFD (DE ANNUNZIO *et al.*, 2017).

Um considerável número de investigações foi publicado nos últimos anos com o intuito de avaliar a ação da TFD visando o tratamento da acne (RYU; LEE 2017; LI *et al.*, 2018; MOY; FROST; MOY, 2020; ZEITOUNI *et al.*, 2021). Os compostos que mais vêm sendo investigados em estudos *in vitro* e *in vivo* para o tratamento da acne via TFD são o ALA e o MAL (KHARKWAL *et al.*, 2011; DE ANNUNZIO *et al.*, 2019), ambos têm apresentado melhoras clínicas satisfatórias e semelhantes repostas (WIEGELL; WULF, 2006).

No entanto, o efeito fotossensibilizante desses compostos não é intrínseco, a eficácia é devido à metabolização na unidade pilosebácea à protoporfirina IX (PpIX), em conjunto com o oxigênio molecular e a exposição à luz. Dessa forma, necessitam de um longo tempo de incubação. Em um trabalho de revisão realizado por De Annunzio *et al.*, (2019), foi verificado que os tempos de incubação empregados nos estudos utilizando ALA variaram de 1 a 3 horas e para o MAL a variação de tempo foi de 30 minutos a 3 horas.

Além disso, os tratamentos, ALA-TFD e MAL-TFD podem ser de alto custo, dolorosos, causar reações inflamatórias agudas da pele e

hiperpigmentação transitória (POLLOCK *et al.*, 2004; HONGCHARU *et al.*, 2000). Adicionalmente, a concentração de PpIX aumenta proporcionalmente com o período de incubação, conseqüentemente, períodos de incubação menores resultam em níveis mais baixos de PpIX bem como, efeito terapêutico (JUZENIENE *et al.*, 2006). Dessa forma, investigações empregando outros FSs em aplicações de TFD visando o tratamento da acne são desejáveis.

1.4. Considerações

Para o nosso conhecimento, até o momento não tem sido delineados protocolos de aplicações consecutivas para avaliar a ação da TFD mediada por curcumina, azul de metileno e clorina-e6 contra biofilmes polimicrobianos maduros obtidos de pacientes com acne vulgar. Embora alguns estudos tenham reportado a inativação parcial de biofilmes tratados com TFD, essa terapia é capaz de desarticular a estrutura de biofilmes removendo as camadas celulares mais externas (GOULART *et al.*, 2010; DOVIGO *et al.*, 2011 b), possibilitando que esse biofilme se torne mais suscetível a outras aplicações de TFD ou a outros medicamentos, podendo facilitar a permeação do fármaco. É importante ressaltar ainda que existem poucos estudos que avaliaram a biocompatibilidade dos tratamentos propostos em um modelo de co-cultura 3D de pele.

Dessa forma, julgamos necessário conduzir estudos analisando a ação da TFD mediada por três fotossensibilizadores com propriedades químicas distintas, permitindo avaliar se os efeitos da TFD podem apresentar algum nível de seletividade em relação à molécula de FS utilizada, bem como, avaliar a biocompatibilidade desses tratamentos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar a ação da terapia fotodinâmica mediada por curcumina, azul de metileno e clorina-e6 associada à luz LED azul e vermelho (460 e 660 nm) contra biofilmes polimicrobianos obtidos de pacientes portadores de acne vulgar, assim como identificar os microrganismos presentes nas amostras

clínicas e avaliar a biocompatibilidade dos tratamentos propostos em um modelo de co-cultura 3D de pele. Dessa forma, essa avaliação foi conduzida por meio da realização dos seguintes estudos:

Estudo I - Obtenção das amostras clínicas e a identificação biomolecular dos microrganismos relacionados.

Estudo II - Avaliação da efetividade da terapia fotodinâmica em biofilmes polimicrobianos *in vitro*.

Estudo III – Avaliação *in vitro* da biocompatibilidade da terapia fotodinâmica sobre um modelo de co-cultura 3D de pele.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ESTUDO I - Obtenção das amostras clínicas e a identificação dos microrganismos relacionados

3.1.1. Autorização para obtenção das amostras clínicas

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, o qual aprovou e autorizou a execução da coleta – CAAE: 08917619.5.0000.5426 (documento em anexo).

3.1.2. Critérios de inclusão e exclusão para seleção dos participantes no presente estudo

Os critérios básicos para a inclusão dos pacientes no presente estudo foram apresentar boas condições de saúde geral sem quaisquer alterações sistêmicas evidentes ao exame clínico e ser portador de acne vulgar. Foram excluídos do estudo pacientes que apresentaram histórico positivo referente ao uso de antibióticos de uso tópico ou sistêmico e Isotretinoína no período inferior a seis meses antecedentes ao estudo, no caso das mulheres que faziam uso de anticoncepcional ou haviam descontinuado a utilização no período inferior a seis meses da data da pesquisa, pacientes imunossuprimidos ou imunodeprimidos e que eram portadores de outras doenças de pele.

3.1.3. Coleta das amostras clínicas

Foram selecionados 10 pacientes com acne vulgar, os quais aderiram à pesquisa de forma espontânea, não sendo promovida obrigatoriedade ou constrangimento ao indivíduo. Para cada paciente foi disponibilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (documento em anexo). A coleta foi realizada pela esteticista especialista em Estética Facial e corporal Alessandra Sant'Ana sob supervisão do médico Dr. Márcio Arantes de Almeida, na clínica de Cirurgia plástica intitulada Dr. Márcio Arantes de Almeida, localizada em Araraquara, São Paulo. Para isso, as lesões de acne foram limpas previamente com álcool 70%, a seguir, os comedões, pápulas e pústulas foram extraídos usando um extrator de comedões. As amostras extraídas foram transferidas para um tubo estéril contendo caldo tioglicolato (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil) (SONG *et al.*, 2011) e imediatamente encaminhadas para o laboratório de microbiologia clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP) onde foram processadas.

3.1.4. Meios e condições de cultivo

Para a realização dos ensaios microbiológicos foi preparado o meio de cultura ágar sangue utilizando 20 g/L de *Tryptic soy agar* (TSA Acumedia, Lansing, Michigan, EUA), 26 g/L de ágar *Brain heart infusion* (BHI-Kasvi - Curitiba, PR, Brasil), 10 g/L *Yeast extract* (Kasvi - Curitiba, PR, Brasil) (FONTANA *et al.*, 2009), sendo esterilizado em autoclave (Phoenix Ind. e Com. De Equipamentos Científicos Ltda. - Araraquara, SP, Brasil) a 120°C e resfriado em banho - maria com temperatura constante de 50°C. Após o meio de cultura atingir a temperatura de 50°C foi adicionado 5% (volume/volume) de sangue de carneiro desfibrinado (Ebefarma - Rio de Janeiro, RJ, Brasil) assepticamente. Foi utilizado também o caldo TSB preparado de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras coletadas foram semeadas em ágar sangue a 37°C em condições de anaerobiose.

3.1.5. Caracterização por coloração de Gram e identificação bioquímica das amostras clínicas

Após o cultivo das amostras coletadas dos 10 pacientes, o conteúdo crescido nas placas de ágar sangue foi transferido para tubos de vidro estéreis contendo 10 mL de caldo TSB. A seguir, esse inóculo foi homogeneizado em agitador vórtex e na sequência foi realizada a diluição seriada na base de 10 até a concentração 10^{-7} cél/mL. Após a diluição, alíquotas de 100 µL de cada diluição, de cada paciente, foram semeadas novamente em ágar sangue e cultivadas em anaerobiose a 37°C por 7 dias.

Após os 7 dias de crescimento, foi possível visualizar as colônias isoladas. Dessa forma, as colônias isoladas foram coletadas e parte dessas amostras foi transferida para micro-tubos estéreis (contendo caldo TSB e glicerol a 10%) e foram armazenadas em freezer -20°C. A outra parte das amostras foi utilizada para a realização da coloração de Gram, ensaio de catalase e cultivo das colônias em meio Agar sal manitol Kasvi (Curitiba, PR, Brasil).

3.1.5.1. Coloração de Gram

A coloração foi realizada utilizando o kit de coloração de Gram da Laborclin (Laborclin - Pinhais, PR, Brasil). Para isso, foi feito um esfregaço com as colônias isoladas de todos os pacientes e cada lâmina foi recoberta com solução de violeta genciana por 1 minuto. Após, as mesmas foram cuidadosamente lavadas com água corrente. Na sequência, as lâminas foram recobertas com lugol por 1 minuto, posteriormente o mordente foi desprezado e os esfregaços foram novamente lavados em água corrente. Após esse etapa foi adicionada a solução descorante por 15 segundos sobre as lâminas. Finalmente, o descorante foi removido e foi adicionada fucsina fenicada por 30 segundos. Após, o contracorante foi removido e as lâminas foram novamente lavadas em água corrente. Após a lavagem, todas as lâminas foram cuidadosamente secas com lenço de papel e foram visualizadas no microscópio com a objetiva de aumento de 100x (adaptado de TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

3.1.5.2. Avaliação da presença da enzima Catalase

Para a avaliação da presença da enzima catalase, as colônias isoladas cujas células apresentaram morfologia de cocos foram previamente cultivadas em *Tryptic soy agar* (TSA - Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) e as colônias com células com morfologia de bacilo em *Reinforced Clostridial Agar*. Após o cultivo, colônias isoladas foram transferidas para lâminas e uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% (Farmax - Divinópolis, MG, Brasil) foi dispensada sobre a colônia avaliada. Essa enzima converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Portanto, quando o peróxido de hidrogênio é adicionado sobre colônias bacterianas que produzem a catalase, é possível visualizar imediatamente a formação de bolhas. Dessa forma, as colônias as quais foi observada a formação de bolhas, foram consideradas catalase positiva (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

3.1.5.3. Avaliação da fermentação do manitol

O meio Agar sal manitol utilizado para o cultivo foi da marca Kasvi (Curitiba, PR, Brasil). Esse meio é utilizado para o isolamento de *Staphylococcus* spp. em amostras clínicas. Apresenta em sua composição 7,5% de cloreto de sódio e possui um indicador de pH, fazendo com que o meio mude de cor se o manitol é fermentado. Dessa forma, as colônias que fermentam o manitol são diferenciadas através da mudança da coloração do meio de rosa/ vermelho para a cor amarela. Devido à alta concentração de cloreto de sódio, não ocorre o crescimento de microrganismos que não são capazes de crescer nessas condições. Por isso, esse meio é seletivo e diferencial (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Dessa forma, sugeriu-se que as colônias rodeadas por área amarela poderiam ser identificadas como sendo *S. aureus* e as colônias rodeadas por vermelho/rosa, como *Staphylococcus* coagulase-negativa.

3.1.6. Identificação molecular das amostras clínicas

O ensaio de PCR convencional foi realizado para identificação das espécies bacterianas no laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Araraquara sob a supervisão da Profa. Dra. Marlise Inêz Klein Furlan.

3.1.6.1. Extração de DNA

As cepas de referência utilizadas para avaliar a especificidade dos *primers* foram *Cutibacterium acnes* (ATCC 6919), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), como controle negativo. O protocolo de extração de DNA utilizado para as cepas de referência e as amostras clínicas foi realizado conforme descrito por Klein e Gonçalves, (2003). Dessa forma, as cepas que estavam mantidas em freezer -20°C foram reativadas nos meios específicos de crescimento, preparados de acordo com as recomendações do fabricante (Tabela 1) e os micro-tubos contendo as colônias foram centrifugados por 5 minutos a 10000 xg. A seguir, as amostras foram lavadas duas vezes com solução salina 0,9% estéril. Posteriormente, foram adicionados 500 µL de tampão T.E (10 mM Tris e 1 mM EDTA, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e as amostras foram fervidas em banho-maria a 100°C durante 10 minutos. Após esse procedimento, as amostras esfriaram por 10 minutos, e os micro-tubos foram centrifugados durante 5 minutos, por 10000 xg e 4°C. Em seguida, o DNA foi ressuspensão, removido e transferido para um micro-tubo estéril. Após essa etapa, as amostras foram mantidas em gelo e foi realizada a quantificação do rendimento (DO_{260nm} e razão $DO_{260/280}$) em nanoespectrofotômetro (NanoDrop DS-11, DeNovix, Wilmington, DE, EUA). A quantificação foi realizada em duplicata utilizando 1,25 µL do DNA por leitura. Após a quantificação, as amostras foram armazenadas em freezer -20°C.

Tabela 1. Meios específicos utilizados para o crescimento dos microrganismos.

Microrganismos	Meio de cultivo
<i>C. acnes</i>	<i>Reinforced Clostridial Agar</i> (Kasvi)
<i>S. aureus</i>	<i>Tryptic soy agar</i> (Acumedia)
<i>S. epidermidis</i>	<i>Tryptic soy agar</i> (Acumedia)
<i>E. coli</i>	<i>Brain heart infusion</i> (Kasvi)

Fonte: Elaboração própria.

3.1.6.2. Preparo dos *primers*

Os *primers Forward* e *Reverse* foram sintetizados pela empresa Life Technologies Brasil Com Ind Prod Bio LTDA (São Paulo, SP, Brasil). Na Tabela

2 encontram-se as sequências dos *primers*, valores de temperatura de anelamento e o tamanho do produto dos *primers* utilizados no estudo.

Tabela 2. Descrição da sequência e dos parâmetros dos *primers* utilizados.

Microrganismo	Gene	Sequência dos <i>primers</i> (5' – 3')	TA (°C)	Tamanho do produto (pb)	Referência
<i>C. acnes</i>	16S <i>rRNA</i>	GCGTGAGTGACGGTAATGGGTA TTCCGACGCGATCAACCA	60	131	EISHI <i>et al.</i> , 2002
<i>S. epidermidis</i>	<i>SesC</i>	GTTGATAACCGTCAACAAGG CATGTTGATCTTTTGAATCCC	55	388	FARD <i>et al.</i> , 2015
<i>S. aureus</i>	<i>nuc</i>	GCGATTGATGGTGATACGGTT AGCCAAGCCTTGACGAATAAGC	55	267	BRAKSTAD <i>et al.</i> , 1992

TA: Temperatura de anelamento. *Fonte:* Elaboração própria.

Após a síntese, esses *primers* liofilizados foram preparados para realização dos ensaios. Cada micro-tubo foi centrifugado por 1 minuto (10000 gx) para que todo o conteúdo do micro-tubo fosse sedimentado e não sobrassem resquícios na tampa. Posteriormente, cada *primer* foi ressuspensão adicionando-se tampão T.E, pH 8,0. Foram adicionados 10 µL de T.E por nmol de *primer*, seguindo as recomendações do fabricante. A seguir, as soluções foram homogeneizadas e cada *primer* permaneceu por 15 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, foi feita a quantificação de cada *primer* em nanoespectrofotômetro (NanoDrop DS-11, DeNovix).

As leituras foram realizadas em duplicata e um volume de 1,25 µL foi utilizado para cada leitura a fim de verificar a concentração dessas soluções estoque. Dessa forma, a concentração de 0,1 mM da solução estoque deveria estar próxima da concentração indicada na bula de cada *primer* e esse valor não poderia variar de 20% (para mais ou menos). Os valores da razão A260/A280 deveriam estar entre 1,8-2,1. O preparo das soluções de trabalho foi feito utilizando água de grau molecular (Molecular Grade Water, Ambion). A diluição foi feita adicionando 100 µL do *primer forward*, 100 µL do *primer reverse* e 800 µL de água molecular em micro-tubo de 1,5 mL (concentração final de 10 µM). Após os preparo, alíquotas de 50 µL de cada *primer* bem como as soluções estoque (concentração final 100 µM) foram mantidas em freezer - 20°C.

3.1.6.3. PCR convencional

Foi realizado PCR convencional para cada gene de interesse utilizando o kit *Taq DNA Polymerase, recombinant* (Life Technologies Corpor, Staley Road, Nova Iorque, EUA). Dessa forma, foi feito um Master Mix (volume final de 50 μ L) para cada par de *primer* (concentração ótima de 250 nM).

Os componentes e o volume para cada reação estão disponíveis na Tabela 3.

Tabela 3. Componentes e volume de cada reação de PCR.

Componente	Volume (μ L)
Água molecular	40,25
10X iTaq Buffer	5
50mM MgCl ₂	1,5
10mM dNTP Mix	1
<i>Primer</i> (10 μ M)	1
iTaq DNA Polymerase	0,25

Fonte: Elaboração própria.

Realizado o preparo do Master Mix, foram adicionados 49 μ L em tubos de 0,2 mL contendo 1 μ L do DNA genômico das amostras microbianas (na concentração de 100 ng/ μ L) ou água de grau molecular. Os tubos foram levados ao termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) e os parâmetros empregados no ciclo de amplificação foram:

- **Ciclo 1:** 95°C por 3 minutos;
- **Ciclo 2:** 95°C por 15 segundos;
- Temperatura de anelamento específica para cada a *primer* por 30 segundos;
- 72°C por 11 segundos;
- Repetir 35 vezes.

3.1.6.4. Eletroforese em gel de agarose

Para visualizar as bandas referentes aos produtos de PCR gerados após a reação, as amostras foram submetidas à técnica de Eletroforese em Gel de Agarose (1%). Para isso, foi preparada uma solução tampão 1X TAE (40 mM Tris-Acetate e 1 mM Na₂EDTA, Invitrogen™), (adicionando 100 mL da solução tampão 10X TAE em 900 mL de água molecular ultrapura). Posteriormente, o tampão preparado (TAE 1X) foi utilizado para preencher a cuba de eletroforese e para o preparo do gel de agarose. A porcentagem de agarose utilizada para o preparo do gel foi de 1%. As etapas realizadas para o preparo foram as seguintes:

- I. Foram adicionados em um béquer 50 mL do tampão TAE 1X e 0,5 g de agarose (Invitrogen™). A seguir, essa solução foi aquecida em micro-ondas até que a mesma fosse completamente homogeneizada;
- II. O béquer contendo a solução foi colocado em um agitador magnético a 65°C e foi adicionado 0,8 µL de brometo de etídio (10 mg/mL);
- III. A solução foi dispensada em um suporte nivelado anteriormente com a bancada e contendo o pente em posição. Após a solidificação do gel, o pente foi removido e as amostras foram adicionadas aos *slots*.

Para a realização da corrida, foi adicionado no primeiro *slot* 5 µL de DNA *Ladder* (Invitrogen™). Nos demais *slots*, foram adicionadas as amostras, que foram preparadas homogeneizando 10 µL do produto de PCR e 2 µL da solução de Loading Buffer (Invitrogen™). Posteriormente, foi realizada a corrida horizontal em cuba Bio-Rad com a potência de 70 V durante 60 minutos. Após a corrida as imagens foram adquiridas através do Bio-Rad Gel Doc System® (Bio-Rad Laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, CA, EUA).

3.2. ESTUDO II - Avaliação da efetividade da terapia fotodinâmica em biofilmes polimicrobianos *in vitro*

3.2.1. Desenvolvimento do biofilme maduro

Os biofilmes polimicrobianos foram desenvolvidos de acordo com o modelo *in vitro* de Fontana *et al.*, (2009) modificado. Para a realização desta técnica, foram utilizadas placas de 96 poços (Kasvi - Curitiba, PR, Brasil). O biofilme foi formado a partir de um pool de amostras dos 10 pacientes. Previamente a formação do biofilme, as amostras foram descongeladas semeadas em ágar sangue e incubadas em anaerobiose durante 7 dias. Após esse período foi feito um inóculo em tampão PBS raspando com uma alça de inoculação de 10 µL toda a amostra microbiana crescida no ágar. A seguir, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 5000 xg e as células foram lavadas com tampão PBS 2 vezes. Após esse procedimento, o tampão foi retirado e foi adicionado 5 mL de caldo TSB (Tubo 1). Em um segundo tubo (Tubo 2), foi adicionado 9 mL de caldo TSB. A seguir, 1 mL da solução contendo os microrganismos do tubo 1 foi adicionado no tubo 2 a fim de formar uma suspensão com turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala turbidimétrica de Mc Farland. Com o auxílio de um espectrofotômetro, a densidade óptica desse inóculo foi lida em 630 nm e a leitura foi ajustada nos valores de 0,08 - 0,1 ($\sim 1 \times 10^8$ cél/mL).

Após o ajuste, cada poço da placa de 96 poços foi cuidadosamente preenchido com 200 µL do inóculo. As amostras foram incubadas em anaerobiose, a uma temperatura de 37°C, durante 48 horas. Após 72 horas de formação do biofilme, o meio de cultura foi renovado, e a placa de 96 poços contendo as amostras foi incubada novamente por 24 horas, nas mesmas condições descritas, totalizando quatro dias de formação, no qual o biofilme estava em seu estado maduro.

3.2.2. Avaliação da viabilidade celular através da Microscopia de fluorescência Confocal

O biofilme foi formado em placas de 24 poços, adicionando em cada poço 2 mL do inóculo, preparado conforme descrito anteriormente no item 3.2.1. As soluções de syto-9 e iodeto de propídio (Molecular Probes, Invitrogen™)

foram preparadas adicionando 5 μL de cada sonda (a partir da solução estoque) em 5 mL de tampão PBS. Após o preparo, 500 μL da solução contendo ambos os marcadores foi adicionada cuidadosamente em cada poço da placa contendo as amostras. As placas foram incubadas em atmosfera livre de oxigênio a 37°C durante 30 minutos. Após a incubação, a solução contendo os marcadores foi removida dos poços e as amostras de biofilmes foram lavadas uma vez com tampão PBS. A seguir, foram adicionados em cada poço 1 mL de tampão PBS e as amostras foram analisadas utilizando o microscópio de fluorescência confocal (Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan) na objetiva de 20 e 40x. As faixas de lasers utilizadas para detecção foram 488 nm até 520 nm para Syto-9 e 561 nm até 620 nm para iodeto de propídio (ZAGO *et al.*, 2020).

3.2.3. Tratamento fotodinâmico

3.2.3.1. Fotossensibilizadores e fontes de luz

Os fotossensibilizadores utilizados neste estudo foram a curcumina e a clorina-e6, sintetizadas pelo grupo de pesquisa do Dr. Kleber Thiago de Oliveira, docente do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, SP (UFSCar) e o azul de metileno, adquirido da empresa Sigma (Sigma Chemical Co - St. Louis, MO, EUA). As fontes de luz utilizadas foram sistemas de *Light Emitting Diodes* (LEDs) de 460 e 660 nm fabricados pela IrradLED® – biopdi (São Carlos, SP, Brasil) (Figura 5).

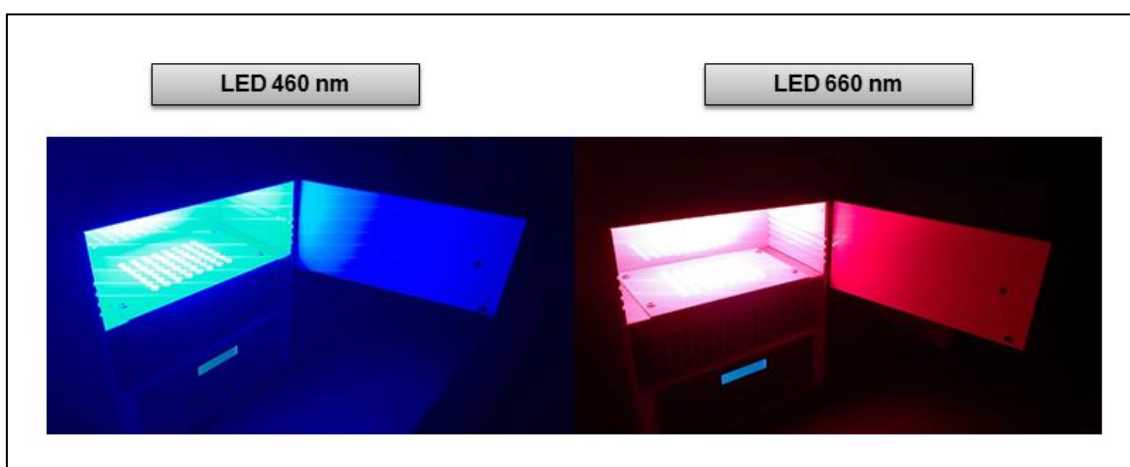


Figura 5. Imagem representativa das fontes de luz utilizadas no estudo (LED 460 e 660 nm). *Fonte:* Elaboração própria.

3.2.3.2. Parâmetros utilizados nos ensaios de terapia fotodinâmica

As concentrações dos fotossensibilizadores estudadas foram 75, 100 e 150 µg/mL. As fluências utilizadas foram 75, 100, 150 e 200 J/cm² para a fonte de luz vermelha (660 nm /129 mW/cm²) e para o LED azul foram utilizadas as seguintes fluências: 50, 75, 100, 150 e 200 J/cm² (460 nm / 150 mW/cm²) (ZAGO *et al.*, 2020).

O tempo de pré-irradiação dos fotossensibilizadores utilizados nesse estudo foi determinado de acordo com o ensaio de internalização utilizando o MFC. Dessa forma, o tempo de pré-irradiação utilizado para a curcumina foi de 30 minutos, 1 minuto para o azul de metileno e 10 minutos para os ensaios com a clorina-e6. As soluções de FS foram preparadas no momento da utilização em tubos estéreis protegidos da luz, considerando as solubilidades individuais de cada molécula, de acordo com o protocolo adaptado de Sampaio *et al.*, 2020. Ensaio prévios do grupo (DE ANNUNZIO *et al.*, 2017) demonstraram que a curcumina apresentou uma melhor solubilidade em solução de sacarose 0,5%. Dessa forma, a curcumina foi preparada inicialmente em DMSO (solução estoque) e a solução de trabalho foi realizada em solução estéril de sacarose 0,5% (Synth, Diadema, SP, Brasil). As soluções estoque e de trabalho utilizadas nos experimentos com biofilme foram preparadas conforme descrito na Tabela 4:

Tabela 4. Soluções estoque e de trabalho utilizadas nos ensaios de TFD em biofilmes.

FS	Solução estoque	Solução do ensaio
Curcumina	15 mg/mL em DMSO	75, 100 e 150 µg/mL / em sacarose 0,5% e DMSO 1%
Azul de Metileno	2 mg/mL em solução salina estéril (0,9%)	75, 100 e 150 µg/mL /em caldo TSB
Clorina-e6	3 mg/mL em água ultra-pura estéril e DMSO (10%)	75,100 e 150 µg/mL/ em caldo TSB e DMSO 1%

Fonte: Elaboração própria *As concentrações de FS utilizadas nos testes de TFD foram obtidas através das soluções de ensaio.

3.2.3.3. Caracterização fotoquímica e fotofísica dos fotossensibilizadores

Os espectros UV-Vis foram determinados antes e após a irradiação dos fotossensibilizadores estudados na concentração de 75 µg/mL, utilizando a fluência de 50 J/cm² para o LED 460 nm e fluência de 200 J/cm² para o LED 660 nm a fim de verificar se essas moléculas fotossensíveis estariam disponíveis e não teriam degradado por completo durante todo o período de irradiação.

A fluência total foi dividida em três tempos. Nos testes utilizando a curcumina, os tempos de irradiação avaliados foram 111, 222 e 333 segundos. Quanto aos ensaios com o azul de metileno e a clorina-e6, a fluência total foi dividida nos seguintes tempos de irradiações: 310, 620, 932, 1240 e 1550 segundos. Além disso, as amostras que foram irradiadas durante 1550 segundos, foram irradiadas mais uma vez por 1550 segundos (totalizando 3100 segundos), para verificarmos se o fotossensibilizador teria degradado por completo após mais uma aplicação fotodinâmica na fluência de 200 J/cm².

As medidas foram realizadas no equipamento (SynergyH1 Multi-Mode Reader, BioTek, Winooski, VT, EUA) adicionando um volume de 100 µL das soluções dos FSs em cada poço de uma microplaca. Os ensaios foram realizados em triplicata em três ocasiões independentes (n=9).

3.2.3.4. Avaliação da Internalização dos fotossensibilizadores nas amostras de biofilme através da Microscopia de fluorescência Confocal

A internalização dos fotossensibilizadores propostos foi avaliada qualitativamente e quantitativamente utilizando o microscópio de fluorescência confocal (Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan) e o Software ZEN BLUE 2.3 Systems.

Os biofilmes foram formados em placas de 24 poços conforme descrito anteriormente e posteriormente, as amostras foram incubadas com os fotossensibilizadores durante 1, 5, 10, 15 e 30 minutos a fim determinar o melhor tempo de pré-irradiação. A concentração dos três fotossensibilizadores

avaliados foi de 75 µg/mL. Para as amostras incubadas com AM e Ce6 foram utilizados lasers em 561 nm para emissão e 700 nm para detecção. Para avaliar a internalização da CUR nas amostras de biofilmes foram utilizados lasers em 488 nm de excitação e 530 de detecção (ZAGO *et al.*, 2020).

Todas as amostras foram divididas em 18 slices. Para avaliar a internalização do AM e Ce6 a abertura do pinhole foi 2,43AU/95 µm com ganho de 800 V. Quanto à internalização da CUR foi utilizada uma abertura de pinhole de 2,81 AU/93 µm com ganho de 779 V. A área de leitura para todos os poços foi de 0,39 mm². Foram utilizados grupos controle sem tratamento para avaliar a autofluorescência das amostras de biofilmes e o valor de unidade relativa de fluorescência referente a cada controle foi subtraído dos valores referentes às amostras tratadas com os fotossensibilizadores. A fim de verificar se a penetração dos FSs foi homogênea foram avaliados três campos equidistantes de uma mesma amostra. Os poços foram analisados em objetiva de 10x de aumento.

3.2.3.5. Avaliação da viabilidade celular através da contagem de UFC/mL

Objetivando evitar qualquer interferência durante as irradiações cada placa recebeu apenas um tipo de tratamento. De acordo com as dimensões do campo de irradiação, com o tempo de exposição das amostras à luz e com a potência de cada LED foi definida a fluência. Para que fosse calculada a fluência a seguinte fórmula foi empregada:

$$\text{Fluência (J/ cm}^2\text{)} = I \text{ (W/cm}^2\text{)} \times t \text{ (segundos)}$$

Sendo, **J**: Joules; **cm²**: centímetro quadrado; **I**: intensidade; **W**: Watt; **t**: tempo.

A partir do quarto dia de formação do biofilme, as amostras foram submetidas aos tratamentos fotodinâmicos (um tratamento por dia). Após cada tratamento, para a remoção das amostras de biofilme formado, cada poço foi cuidadosamente raspado durante 15 segundos, utilizando uma alça rígida de inoculação de 1 µL. O conteúdo foi aspirado, transferido para micro-tubos estéreis e homogeneizado em agitador vortéx durante 30 segundos. A seguir

foi realizada a diluição seriada na base de 10 até a concentração de $\sim 10^{-7}$ cél/mL e a seguir, alíquotas de 100 μ L de cada diluição das amostras foram semeadas em meio sólido ágar sangue em duplicatas. Posteriormente, as placas de Petri contendo as amostras foram incubadas em anaerobiose, a 37°C. As unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foram contabilizadas após 7 dias de incubação.

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, $q= 0,1$, pois o volume semeado em meio sólido foi de 100 μ L.

Os grupos avaliados nesse ensaio foram os seguintes:

❖ **Grupo1: Controle de Crescimento (Cc)**

Nenhum tratamento foi aplicado neste grupo. Alíquotas 100 μ L do caldo TSB foram dispensadas nos poços, sobre o biofilme formado. 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 2: Luz (+L-FS)**

Neste grupo foi avaliado se a aplicação da luz na ausência dos FSs poderia apresentar efeitos tóxicos para os microrganismos. Dessa forma, alíquotas de 100 μ L de caldo TSB foram adicionadas aos poços desejados e em seguida foi realizado o ensaio com as fluências de luz mencionadas anteriormente.

❖ **Grupo 3: fotossensibilizador (-L+FS)**

Para avaliação da toxicidade dos diferentes FSs sobre as amostras, alíquotas de 100 µL dos FSs preparados nas concentrações desejadas foram dispensadas nas placas contendo as amostras microbianas e mantidas no escuro com as concentrações de trabalho desejadas durante 1, 10 ou 30 minutos (dependendo do FS utilizado), somado ao tempo referente a cada fluência avaliada, mimetizando o tempo no qual o FS ficaria em contato com as amostras durante os tratamentos fotodinâmicos.

❖ **Grupo 4: terapia fotodinâmica antimicrobiana (+L+FS)**

Neste grupo foi avaliada a ação da TFD mediada por CUR, AM e Ce6. Desta forma, alíquotas de 100 µL das concentrações de FS foram dispensadas sobre as amostras e pré-incubadas no escuro durante os tempos de pré-irradiação citados anteriormente, após esse período, a placa contendo as amostras foi irradiada com as fluências de luz mencionadas.

❖ **Grupo 5: DMSO 1%**

Esse grupo avaliou se o DMSO a 1% (concentração final que o DMSO estava durante o teste) apresentou toxicidade para as amostras. Os ensaios foram realizados inoculando 100 µL do meio de cultura contendo o DMSO na referida concentração em poços de placa de 96 poços. Quando incubada no escuro, essa solução ficou em contato com as amostras o mesmo tempo no qual as amostras utilizando Ce6 permaneceram no ensaio de TFD.

❖ **Grupo 6: Sacarose 0,5%**

Esse grupo avaliou se a solução de sacarose 0,5% utilizada para solubilizar a solução de curcumina apresentou alguma interferência sobre as amostras de biofilme. Os ensaios foram realizados inoculando 100 µL da solução de sacarose 0,5% em poços de placa de 96 poços. Quando incubada no escuro, essa solução ficou em contato com as amostras o mesmo período no qual as amostras utilizando CUR permaneceram no ensaio de TFD.

3.2.3.6. Avaliação dos componentes proteicos da matriz do biofilme por meio de Microscopia de Fluorescência Confocal

O dano nos componentes proteicos da matriz foi avaliado qualitativamente e quantitativamente utilizando o microscópio de fluorescência confocal (Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan) e o Software ZEN BLUE 2.3 System. As amostras foram divididas em 12 slices, com ganho de 780 V e utilizando uma abertura de pinhole de 2,30 AU/ 85 µm. Para realização do ensaio, os biofilmes foram formados *in vitro* e tratados conforme descrito anteriormente, em microplacas de 96 poços. Após os tratamentos, os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão PBS (200 µL) e posteriormente, 100 µL da solução de SYPRO® Ruby Biofilm Matrix Stain (Invitrogen™) foi adicionada em cada poço. As placas foram incubadas em anaerobiose a 37°C durante 30 minutos, protegidas da luz. Após esse período, o marcador foi retirado das amostras, e em cada poço foram adicionados 100 µL do tampão PBS. A seguir, as amostras foram visualizadas no Microscópio de Fluorescência Confocal (excitação: 488 nm; detecção: 700 nm). Foram analisados campos equidistantes de uma mesma amostra e os poços foram analisados em objetiva de 10x de aumento.

3.3. ESTUDO III - Avaliação da biocompatibilidade da terapia fotodinâmica sobre um modelo de co-cultura 3D de pele

3.3.1. Cultivo celular

Foram utilizados fibroblastos (HDFn ATCC PCS-201-010 TM) derivados de linhagem celular primária, isolados de pele e queratinócitos imortalizados (HaCaT código BCRJ 0341) ambos derivados da pele de um adulto saudável. As células foram cultivadas em *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM high glucose - 4,5 g/L, Sigma St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB, Gibco, Life Technologies, EUA), e 1% (v/v) de antibiótico e antimicótico (penicilina G -10.000 µg/ml, estreptomicina - 10.000 µg/ml e anfotericina B - 25 µg/ml) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) (CASTILHO *et al.*, 2010). O cultivo celular foi realizado a 37°C com 5% de CO₂.

3.3.2. Desenvolvimento do Modelo de Co-cultura Tridimensional (3D) de pele

Os tecidos foram formados quando as células estavam entre as passagens 3 e 10 e as culturas apresentaram 70% de confluência, cultivadas em garrafas de 75 cm² (Kasvi - Curitiba, PR, Brasil).

As células foram lavadas com PBS estéril pH 7,2 (PBS 1X - NaCl 140 mmol.L⁻¹, KCL 3,0 mmol.L⁻¹, Na₂HPO₄ 4,30 mmol.L⁻¹, KH₂PO₄ 1,4 mmol.L⁻¹) e soltas com solução de tripsina (0,05% v/v) / EDTA (0,53 mM/L) (Sigma-Aldrich, MO, EUA), e centrifugadas a 400 xg por 5 minutos. O protocolo utilizado para a formação do tecido foi adaptado de Pimentel *et al.*, (2022). Para o preparo da camada dérmica foi utilizado 2,5 mL de DMEM (high glucose - 4,5 g/L) com antibiótico e antimicótico, 500 µL de soro fetal bovino e 2,0 mL de colágeno tipo I produzido a partir da cauda de ratos *Wistar* conforme descrito por Barbugli, (2010). Essa solução foi neutralizada com 30 µL NaOH 1M e foi adicionado 2,5 mL da suspensão de fibroblastos a 0,3 x10⁶ por mL. Essa mistura foi preparada em tubo estéril de 50 mL em isopor com gelo.

Após o preparo, um volume de 1,0 mL dessa mistura foi adicionado em cada poço de uma placa de 24 poços (Kasvi - Curitiba, PR, Brasil) e as amostras incubadas durante 2 horas para polimerização da camada dérmica. Após esse período, para a formação da camada epitelial, um volume de 200 µL da suspensão de queratinócito na concentração de 2,1 x 10⁶ células/mL preparada em meio DMEM com 5% de SFB foi dispensado em cada poço sobre as camadas dérmicas e as amostras incubadas por 17 horas. Posteriormente, o meio foi retirado e foram adicionados 400 µL do meio KGM-Gold (Lonza, Walkersville, MD, EUA) suplementado com 0,5 mL de hidrocortisona, 0,5 mL de transferrina, 0,25 mL de epinefrina, 0,5 mL de sulfato de gentamicina anfotericina-B, 2,0 mL de extrato de pituitária bovina, 0,5 mL de fator de crescimento epidérmico humano e 0,5 mL de insulina. As amostras foram incubadas por 6 horas e a seguir, realizados os tratamentos fotodinâmicos. Os tecidos foram preparados em triplicada e os experimentos realizados em 2 ocasiões distintas (n=6).

3.3.3. Aplicação da terapia fotodinâmica sobre os modelos de Co-cultura Tridimensional (3D) de pele

Após o desenvolvimento do tecido, o meio KGM-Gold suplementado foi retirado dos poços e 500 µL de tampão PBS foram adicionados nos grupos controle de crescimento sem tratamento e nos grupos de controle de luz; e 500 µL das soluções de azul de metileno, clorina-e6 e curcumina nas concentrações de 75 µg/mL nos grupos TFD e FS na ausência de luz. Foram utilizadas placas distintas para os grupos tratados com exposição e ausência de luz. A irradiação foi realizada por cima da placa de 24 poços e a fluência utilizada foi de 50 J/cm² para a luz azul e 200 J/cm² para a luz vermelha. Após os tratamentos, as soluções foram retiradas dos poços e cada poço foi lavado duas vezes com 400 µL de tampão PBS. A seguir, foram adicionados 400 µL do meio KGM-Gold e os tecidos incubados por 24 horas para realização do ensaio de viabilidade celular pelo método MTT. Os grupos experimentais avaliados foram: amostras de tecidos sem tratamento (CC), tecidos tratados apenas com a luz (L+FS-), tratadas apenas com os fotossensibilizadores (L-FS+), tratadas com luz e fotossensibilizadores (L+FS+), controle de lise (CL) utilizando triton x a 0,9% e controle negativo, poços contendo apenas meio de cultivo (CN).

3.3.4. Viabilidade celular por *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* (MTT)

Para realização do ensaio, o MTT (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi preparado a uma concentração de 3 mg/mL em caldo Roswell Park Memorial Institute - RPMI sem vermelho de fenol (Sigma St. Louis, MO, EUA), 2 vezes concentrado. Após 24 horas da realização dos tratamentos, o meio de cultura foi retirado dos poços da placa e alíquotas de 150 µL da solução de MTT previamente preparada, foram adicionadas em cada um dos poços contendo as amostras de tecido. A seguir, as placas foram incubadas por 4 horas. Após esse período, a solução de MTT foi retirada dos poços e foram adicionados 200 µL de álcool isopropílico (Synth, Diadema, SP, Brasil) em cada poço. Os tecidos foram desestruturados com uma ponteira de 200 µL e alíquotas de 100 µL foram transferidas para placas de 96 poços (n=12). A seguir, foi lida a absorbância em 562 nm no leitor EZ Read 400 Microplate reader – BioChrom, com o auxílio do software Adapt 2.0 BioChrom.

3.3.5. Caracterização e viabilidade celular do modelo de co-cultura 3D de pele por meio de Microscopia de fluorescência confocal

A caracterização do modelo 3D e a viabilidade celular após os tratamentos foram analisadas por meio da técnica de Microscopia de Fluorescência Confocal de acordo com protocolo adaptado de Pimentel *et al.*, (2022). Os grupos experimentais avaliados foram amostras de tecidos sem tratamento (CC), tecidos tratados apenas com a luz (L+FS-), tratados com os fotossensibilizadores (L-FS+), tratados com luz e fotossensibilizadores (L+FS+) e com Triton - X a 0,9% (Sigma-Aldrich) sendo este o controle de lise (CL).

Para a realização do ensaio, o meio KGM-Gold suplementado foi removido dos poços e os tecidos foram lavados uma vez com tampão PBS. A seguir, foi adicionado em cada poço 500 µL de iodeto de propídio (PI - 1:1000) (Sigma-Aldrich) e as amostras foram incubadas por 15 minutos. Após esse tempo, a solução de PI foi removida dos poços e as amostras foram lavadas duas vezes com PBS. A seguir, foram adicionados 500 µL por poço de paraformaldeído (4% v/v) (Synth, Diadema, SP, Brasil) para fixação e as amostras foram incubadas a 37°C durante 20 minutos. Após a fixação, as amostras foram lavadas uma vez com PBS, foram adicionados 500 µL em cada poço de Triton-X (0,1% v/v) (Sigma-Aldrich) e as amostras foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente. Na sequência, a solução de Triton-X foi removida e os tecidos foram lavados duas vezes com PBS. Posteriormente, as células foram marcadas adicionando 500 µL da solução de ActinGreen™ 488 Reagente Ready Probes™ (25 µL por mL) em PBS (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) e os tecidos foram incubados durante 30 minutos em proteção da luz. Posteriormente, a sonda foi retirada, foram adicionados em cada poço 500 µL de Hoechst 33342 (1 µL por mL) em PBS (Sigma-Aldrich) e as amostras foram incubadas em proteção da luz e em temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse período, as amostras foram novamente lavadas uma vez com tampão PBS e um volume de 500 µL de PBS foi adicionado em cada poço antes da aquisição das imagens no microscópio de fluorescência confocal (Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan). Os lasers utilizados foram 405 com detecção até 470 nm para o Hoechst 33342, 488 com detecção até 530 nm para o

marcador ActinGreen™ e a partir de 600 nm para o PI foram. As amostras foram analisadas em objetiva de 10x de aumento.

3.4. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de normalidade (Teste de Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnov). Considerados normais, para comparar os valores das variáveis contínuas entre os grupos foram utilizados o teste de Análise de Variância (one-way ANOVA), com pós-teste de Tukey e o teste T. 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, $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESTUDO I

4.1.1. Caracterização por coloração de Gram e identificação bioquímica das amostras clínicas

A coloração de Gram demonstrou que os isolados de todos os pacientes eram Gram-positivos. Foram encontrados isolados com a morfologia de bacilo e cocos (exceto nos pacientes 5 e 6, os quais foram encontrados apenas bacilos). Posteriormente, foi realizado o ensaio de catalase e foi verificada a formação de bolhas (H_2O e O_2) em todos os isolados, em ambas as morfologias observadas, indicando a presença da enzima. Dessa forma, considerou-se que os bacilos Gram-positivos poderiam ser *C. acnes*, tendo em vista que essa bactéria é um bacilo Gram-positivo, apresenta a enzima catalase (CAUICH-SANCHEZ *et al.*, 2001) e é frequentemente isolada das lesões de acne vulgar (NEVES *et al.*, 2015).

Quanto aos isolados que apresentaram morfologia de cocos, estes foram semeados em ágar manitol a fim de identificar quais eram sugestivos de *S. aureus* e quais seriam sugestivos de *Staphylococcus coagulase-negativa*. Dessa forma, após o cultivo, as placas em que o ágar apresentou coloração amarela indicaram a presença de *S. aureus*. Conforme representado na Tabela

5, as amostras de 4 pacientes apresentaram isolados que fermentaram o manitol. Dentre estes, também foi verificada a presença de isolados que não fermentaram o manitol (Pacientes 1, 2, 3 e 4), indicando a presença de duas espécies de *Staphylococcus*.

Foi verificado que os isolados de 8 pacientes não fermentaram o manitol, indicando o crescimento de *Staphylococcus* coagulase-negativa. Dentre estes, *S. epidermidis* tem sido frequentemente isolado de lesões de acne (JUSUF *et al.*, 2020). Dessa forma, considerando as características da parede bacteriana, morfologia, a não fermentação do manitol e o ensaio de catalase, esses isolados foram considerados como sendo sugestivos de *S. epidermidis*.

Esses ensaios foram importantes para o rastreio inicial das bactérias presentes nas amostras e trouxeram repostas quanto às características morfológicas, estrutura da parede das bactérias isoladas e a presença da enzima catalase. O cultivo em meio manitol possibilitou a confirmação da presença de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase-negativo. Dessa forma, para uma investigação mais precisa das espécies bacterianas presentes nas amostras foi realizado o ensaio de PCR convencional.

Tabela 5. Representação dos resultados dos ensaios de coloração de Gram e identificação bioquímica das amostras clínicas.

Método	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P 10	Pool
Coloração de Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentou Manitol	+	+	+	+	ND	ND	-	-	-	-	+
Não fermentou Manitol	+	+	+	+	ND	ND	+	+	+	+	+

(+ indica positivo/ - indica negativo / ND – não detectado crescimento. (P1) Paciente 1; (P2) Paciente 2; (P3) Paciente 3; (P4) Paciente 4; (P5) Paciente 5; (P6) Paciente 6; (P7) Paciente 7; (P8) Paciente 8 ;(P9) Paciente 9; (P10) Paciente 10; PO: pool). *Fonte:* Elaboração própria.

4.1.2. Identificação molecular das amostras clínicas

Para identificação molecular das espécies bacterianas encontradas nas amostras, foram utilizados *primers* específicos em que a sequência de nucleotídeos foi previamente descrita e validada na literatura. O *primer* utilizado para identificar *C. acnes* foi sintetizado para amplificar a porção 16S rRNA dessa espécie conforme descrito por Eishi *et al.*, (2002). Para identificação de *S. epidermidis* o *primer* utilizado nesse estudo amplificou o gene *SesC*, específico da proteína C dessa espécie (FARD *et al.*, 2015) . Quanto a *S. aureus*, o *primer* utilizado amplificou uma sequência do gene *nuc*, que codifica a nuclease termoestável dessa bactéria (BRAKSTAD; AASBAKK; JOHAN, 1992).

4.1.3. Quantificação do rendimento da extração de DNA

O DNA de todas as amostras foi extraído e quantificado conforme descrito por Klein e Gonçalves, (2003). Nas Tabelas 6 e 7 é possível verificar que após a extração, a cepas de referência e as amostras clínicas apresentaram rendimento de DNA.

Tabela 6. Quantificação do DNA pós-extração das cepas padrão.

Espécie	Leitura 1	Leitura 2	Média das leituras	260/280 Leitura 1	260/280 Leitura 2	Rendimento (µg)
<i>C. acnes</i>	324,60	330,54	327,57	1,90	1,91	162,96
<i>S. epidermidis</i>	183,23	199,91	191,57	1,93	1,97	95,30
<i>S. aureus</i>	303	298,84	300,92	1,99	1,93	149,70
<i>E. coli</i>	251,07	272,19	261,63	1,90	1,80	130,16

Fonte: Elaboração própria

Tabela 7. Quantificação do DNA pós-extração das amostras clínicas.

Amostra	Leitura 1	Leitura 2	Média das leituras	260/280 Leitura 1	260/280 Leitura 2	Rendimento (µg)
Paciente 1	297,63	258,00	277,81	2,46	2,46	138,21
Paciente 2	66,08	62,04	64,06	2,50	2,54	31,86
Paciente 3	123,91	147,62	135,76	2,58	2,62	67,54
Paciente 4	96,54	79,62	88,08	2,58	2,75	43,81
Paciente 5	137,50	133,50	135,50	2,48	2,48	67,41
Paciente 6	269,33	297,56	283,44	2,46	2,19	141,01
Paciente 7	261,86	250,70	256,28	2,63	2,62	127,49
Paciente 8	279,75	283,57	281,66	1,26	1,12	140,12
Paciente 9	187,81	159,08	173,44	2,68	2,75	86,28
Paciente 10	121,31	117,20	119,25	2,56	2,29	59,32
Pool	166,51	175,06	170,78	2,44	2,46	84,96

Fonte: Elaboração própria

4.1.4. Preparo e quantificação dos *primers*

De acordo com a metodologia descrita no item 3.1.6.2 os *primers* liofilizados foram ressuspedidos em T.E de acordo com o volume correspondente ao peso molecular (nmol) de cada *primer* (Tabela 8).

Tabela 8. Volume de T.E utilizado para diluição dos *primers*.

Nome <i>primer</i>	Concentração (nMol)	Volume TE (µL)
CACNF	40,8	408
CACNR	42,3	423
SEPIF	39,0	390
SEPIR	39,6	396
NUCF	54,6	546
NUCR	55,7	557

Fonte: Elaboração própria.

A fim de verificar se a concentração estava correta, alíquotas de 1,25 µL foram quantificadas em nanoespectrofotômetro (Tabela 9). A partir dos resultados obtidos foi verificado que as concentrações estavam de acordo com o peso molecular de cada *primer*, e nenhum valor ultrapassou 20% do peso molecular de todos os *primers* avaliados. Após esse procedimento, estes foram

diluídos a 10 µM conforme descrito anteriormente no item 3.1.6.2, e as soluções foram armazenadas em freezer -20°C até o momento do uso.

Tabela 9. Média das concentrações dos *primers*.

Nome <i>primer</i>	Média das leituras (ng/µL)	Concentração estimada (ng/µL)
CACNF	729,20	689,54
CACNR	482,28	542,86
SEPIF	622,71	615,00
SEPIR	679,03	636,22
NUCF	693,34	653,22
NUCR	876,14	733,98

Fonte: Elaboração própria.

4.1.5. Produtos de PCR - Eletroforese em gel de agarose

A identificação molecular das amostras biológicas coletadas dos 10 pacientes que apresentavam acne vulgar demonstrou que *C. acnes* foi identificado em todos os pacientes (Figura 6-A). Na figura 6-B foi possível observar que *S.aureus* foi identificado nas amostras clínicas de 4 pacientes. *S. epidermidis* foi identificado em 8 amostras (Figura 6-C). É importante mencionar também que as três cepas foram identificadas nas amostras do pool, utilizadas nos ensaios fotodinâmicos. Além disso, os *primers* avaliados identificaram as cepas de referência, comprovando sua especificidade com a espécie alvo e tamanho de produto. As reações também foram realizadas com o DNA genômico de *E. coli* (controle negativo), a fim de confirmar a especificidade dos *primers* e não foi verificada amplificação em nenhum ensaio. Como controle da ausência de contaminantes nos reagentes, foram realizadas reações contendo água molecular no lugar do material genético e não foi observada amplificação (Figura 6 – A, B, C).

O crescimento de *C. acnes*, *S. epidermidis* e *S. aureus* em condições de anaerobiose, em amostras extraídas de lesões de acne, também foi descrito por Jusuf *et al.*, (2020). Adicionalmente, no estudo realizado por Leyden *et al.*, 1998 os autores verificaram que *C. acnes* foi encontrado em 95% das lesões inflamatórias de pré-adolescentes. Em outro estudo conduzido por Syahrial *et al.*, (2009), os autores também identificaram as espécies bacterianas *C. acnes*

(37,2%) e *S. epidermidis* (30,2%) em lesões de acne Moon *et al.*, (2012) relataram que *S. epidermidis* (36%) e *C. acnes* (30%) dominaram os tipos de colônias bacterianas obtidas em pápulas e pústulas de pacientes com acne vulgar. No estudo de Sitohang *et al.*, (2019) também foi verificada a presença de *S. epidermidis* (50,5%) e *C. acnes* (11,0%).

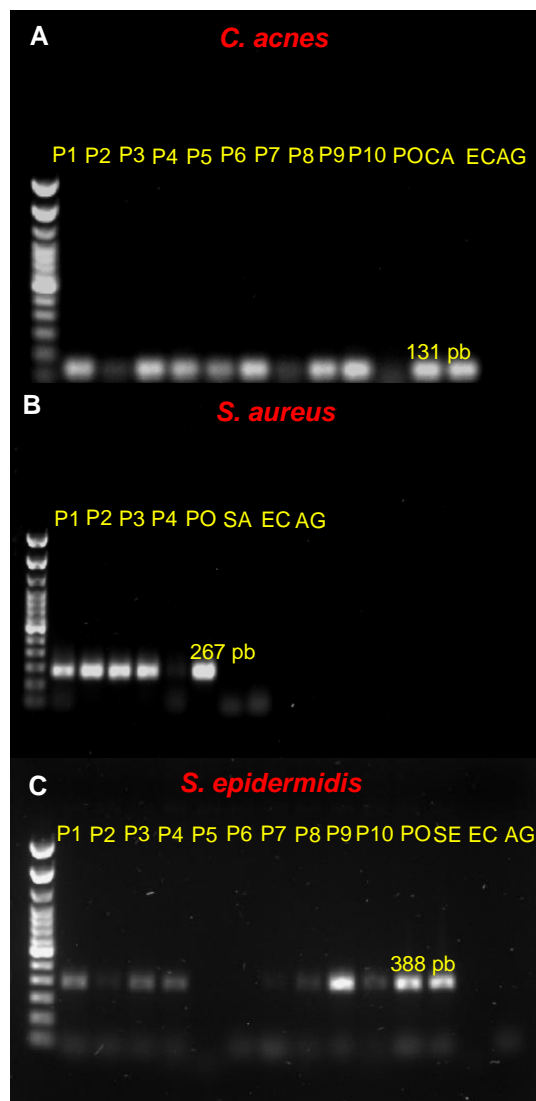


Figura 6: Produtos de PCR visualizados em geral de agarose 1%. A: Produto de PCR - identificação de *C. acnes*. **B:** Produto de PCR- identificação de *S. aureus*. **C:** Produto de PCR – identificação de *S.epidermidis*. (P1) Paciente 1; (P2) Paciente 2; (P3) Paciente 3; (P4) Paciente 4; (P5) Paciente 5; (P6) Paciente 6; (P7) Paciente 7; (P8) Paciente 8 ;(P9) Paciente 9; (P10) Paciente 10; PO: pool; Ec: E.coli ATCC; CA: *C. acnes* ATCC; SA: *S. aureus* ATCC; SE: *S.epidermidis* ATCC; AG: Água.

No presente estudo, o intuito de avaliar a eficácia da TFD em amostras clínicas foi verificar que a terapia poderia inativar microrganismos de um

biofilme polimicrobiano que mimetizasse o biofilme presente nos folículos. Embora a porcentagem dos microrganismos encontrados tenha variado de estudo para estudo, bem como o número de amostras/pacientes, foi possível verificar que *C. acnes*, *S. epidermidis* e *S. aureus*, são espécies que vem sendo frequentemente isoladas das lesões de acne. Dessa forma, de acordo com os ensaios realizados, foi constatado que as amostras utilizadas nesse estudo são constituídas por microrganismos relacionados à patogênese da acne vulgar.

4.2. ESTUDO II

4.2.1. Viabilidade celular por meio da técnica de Microscopia de fluorescência Confocal

A fim de verificarmos a espessura e a viabilidade das amostras dos biofilmes formados *in vitro*, as amostras sem nenhum tratamento foram marcadas com syto-9 e iodeto de propídio (PI) e foram analisadas por meio da Microscopia de Fluorescência Confocal. O syto-9 (marcador de fluorescência verde) é um corante que permeia todas as células presentes no biofilme e o PI (marcador de fluorescência vermelha) é um corante que marca o DNA apenas das células mortas. Desta forma, a prevalência da relação verde/vermelho indica a viabilidade desta cultura, ou seja, quanto maior a prevalência de marcação em verde e menor em vermelho, maior é a predominância de células vivas compondo o biofilme (ZAGO *et al.*, 2019). A partir dessa análise, foi possível verificar que a espessura média do biofilme foi de $104 \pm 2\mu\text{m}$ e que o biofilme manteve a viabilidade celular, apresentando marcação em verde em praticamente toda a extensão da amostra (figura 7A, B e C). Além disso, quando realizada a imagem com objetiva de aumento de 40x foi possível observar a presença de células com diferentes morfologias, indicando que a amostra do biofilme formado é polimicrobiana (figura 7B).

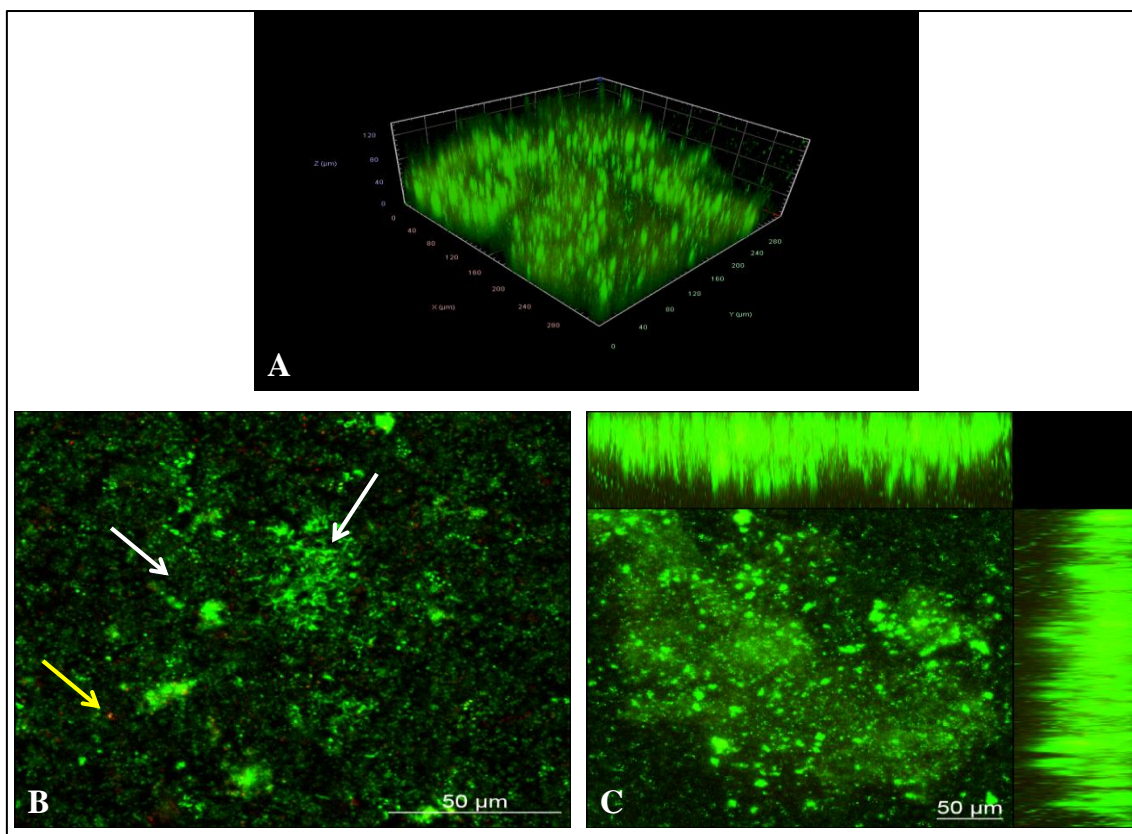


Figura 7. Viabilidade celular dos biofilmes analisados por Microscopia de fluorescência confocal. Amostras marcadas com Syto-9 (células marcada em verde) e iodeto de propídio (células marcadas em vermelho). **A:** imagem analisada em perspectiva 3D. **B:** Destaque para diferentes morfologias observadas (setas brancas) e célula morta em vermelho (seta amarela).

4.2.2. Estudo fotofísico e fotoquímico dos fotossensibilizadores

A fotodegradação de um FS refere-se à alteração fotoquímica de uma molécula de forma que suas propriedades de absorção ou emissão de luz são modificadas. Esse processo ocasiona a redução da atividade fotodinâmica e alteração na intensidade de emissão de fluorescência das moléculas (MANG *et al.*, 2008). Dessa forma, ensaios que avaliem a cinética de fotodegradação são de extrema importância para identificarem se nos parâmetros determinados, as moléculas fotossensíveis ainda estão disponíveis para serem ativadas durante todo o período de irradiação.

No ensaio utilizando a curcumina como FS, foi possível constatar que, houve rápida fotodegradação, corroborando com o estudo de Sampaio *et al.*, (2020) mas, até o final da irradiação, a curcumina não foi degradada por completo (Figura 8 - A). A cinética na ausência de luz (Figura 8 - B) demonstrou um pequeno decaimento da absorbância em função do tempo, sugerindo a

formação de agregados (BACELLAR *et al.*, 2015; KWIATKOWSKI *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2020). Adicionalmente, foi verificado que houve diferença estatística em relação aos valores de absorvância detectados em 460 nm entre os grupos irradiados e os grupos que não receberam irradiação, Teste t, $p=0,0265$ (figura 8 - C).

Com esse ensaio foi possível verificar também o deslocamento do pico de absorção, passando aproximadamente de 440 nm para 380 nm (efeito batocrômico). Esse deslocamento pode ter sido ocasionado devido à formação de fotoprodutos que absorvem luz em comprimentos de onda menores do que a CUR assim como observado no estudo de Dantas, (2017). Além disso, em um estudo realizado por Gordon, (2014), o autor observou que a curcumina sofre uma autoxidação, clivando a cadeia e gerando um novo produto. A análise espectrofotométrica dessa autoxidação da curcumina mostrou o surgimento de um novo pico em 263 nm e desaparecimento do pico em 430 nm.

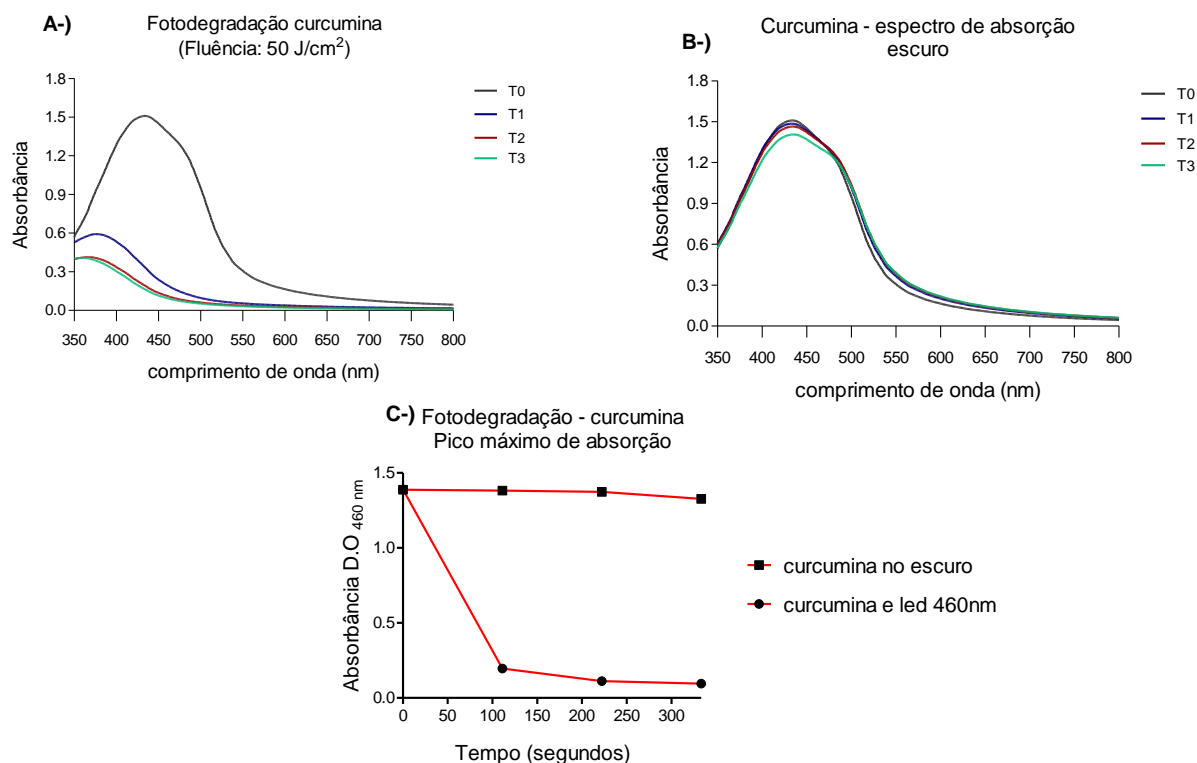


Figura 8. Avaliação da cinética de fotodegradação da curcumina. A: Fotodegradação da curcumina na concentração de 75 µg/mL B: Cinética de fotodegradação da curcumina na ausência de luz C: pico máximo da fotodegradação da curcumina em 460 nm (n=9). (Teste t, p= 0,0265). T0: 0 seg.; T1: 111 seg.; T2: 222 seg.; T3: 333 seg.

Os ensaios utilizando o azul de metileno, também revelaram que os valores de absorbância foram decaindo de acordo com os tempos de irradiação aplicados (figura 9 - A). Esses dados também demonstram que esse FS não havia degradado por completo tanto no período de 1550 segundos como após 3100 segundos de irradiação (figura 9 - A) e não foi observado desaparecimento ou surgimento de uma nova banda. A cinética na ausência de luz demonstrou que não houve degradação do azul de metileno nos diferentes tempos, na ausência de luz (figura 9 - B). Além disso, foi possível verificar que houve diferença estaticamente significativa nos valores de absorbância detectados em 660 nm entre os grupos irradiados e os grupos que não receberam luz, Teste t, p= 0,0073 (figura 9 - C).

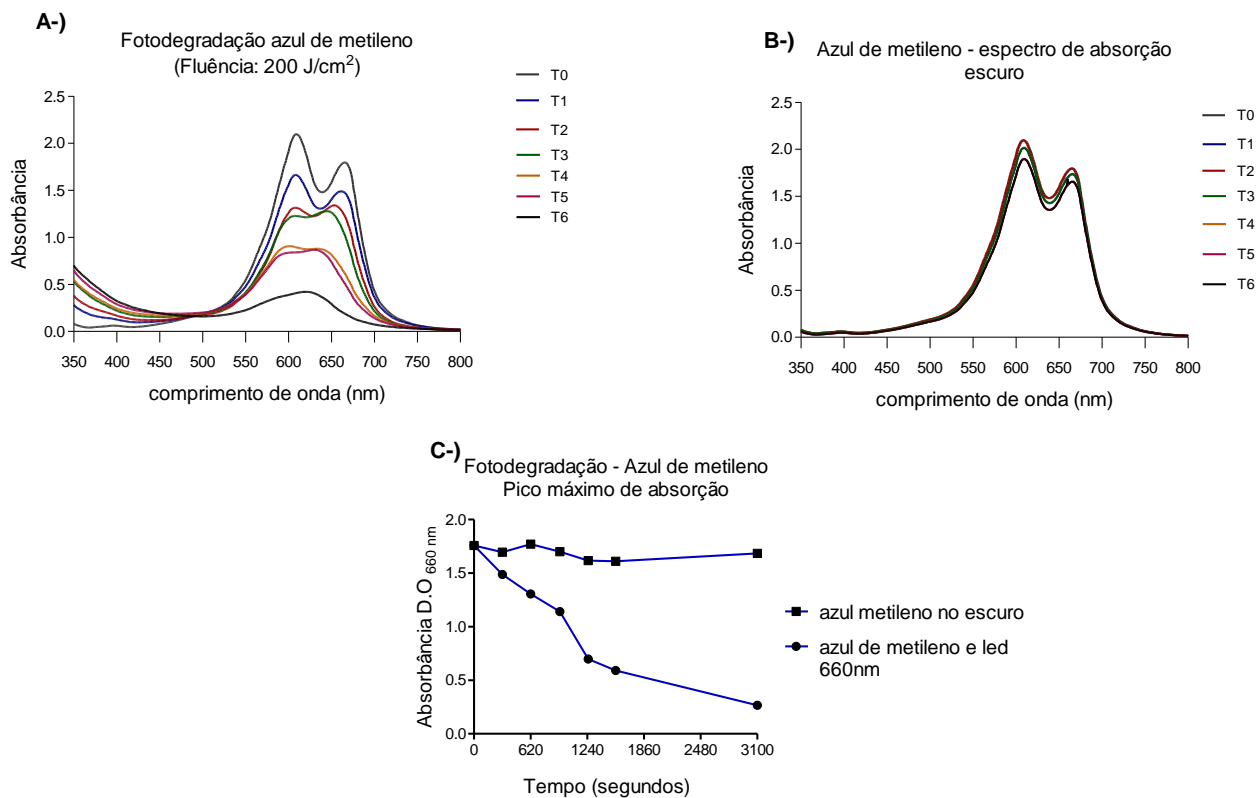


Figura 9. Avaliação da cinética de fotodegradação do azul de metileno. A: Fotodegradação do azul de metileno na concentração de 75 µg/mL B: Cinética de fotodegradação do azul de metileno na ausência de luz C: pico máximo da fotodegradação do azul de metileno em 660 nm (n=9). (Teste t, p= 0,0073). T0: 0 seg.; T1:310 seg.; T2: 620 seg.; T3: 932 seg.; T4:1240 seg.; T5:1550 seg.; T6: 3100 seg.

No ensaio de cinética de fotodegradação da clorina-e6 foi possível observar que os valores de absorbância diminuíram em relação ao tempo (figura 10 – A). Além disso, foi observada uma diminuição de absorção em torno de 400 nm (banda de *Soret*) e das bandas em torno de 505, 500 e 655 nm (banda Q). Em adição, verificou-se um deslocamento na direção de 700 nm. Corrêa, (2006) também observou resultados semelhantes avaliando a fotodegradação do *photodithazine* após irradiação com LED 630 nm sugerindo que essa nova banda formada com o deslocamento refere-se a transformações químicas que acarretaram na formação de fotoprodutos (figura 10 - A). É importante mencionar também que a clorina-e6 não fotodegradou por completo durante os 3100 segundos de irradiação. Esses dados demonstram que havia FS disponível durante todo o período de irradiação.

Na figura 10 - B é possível verificar que não houve degradação da clorina-e6 nos diferentes tempos de incubação, na ausência de luz. Os valores

máximos de absorbância detectados em 660 nm apresentaram diferença estatística entre os grupos irradiados e não irradiados, Teste t, $p < 0,0001$ (figura 10 – C), indicando que o decaimento da absorbância aconteceu devido à irradiação.

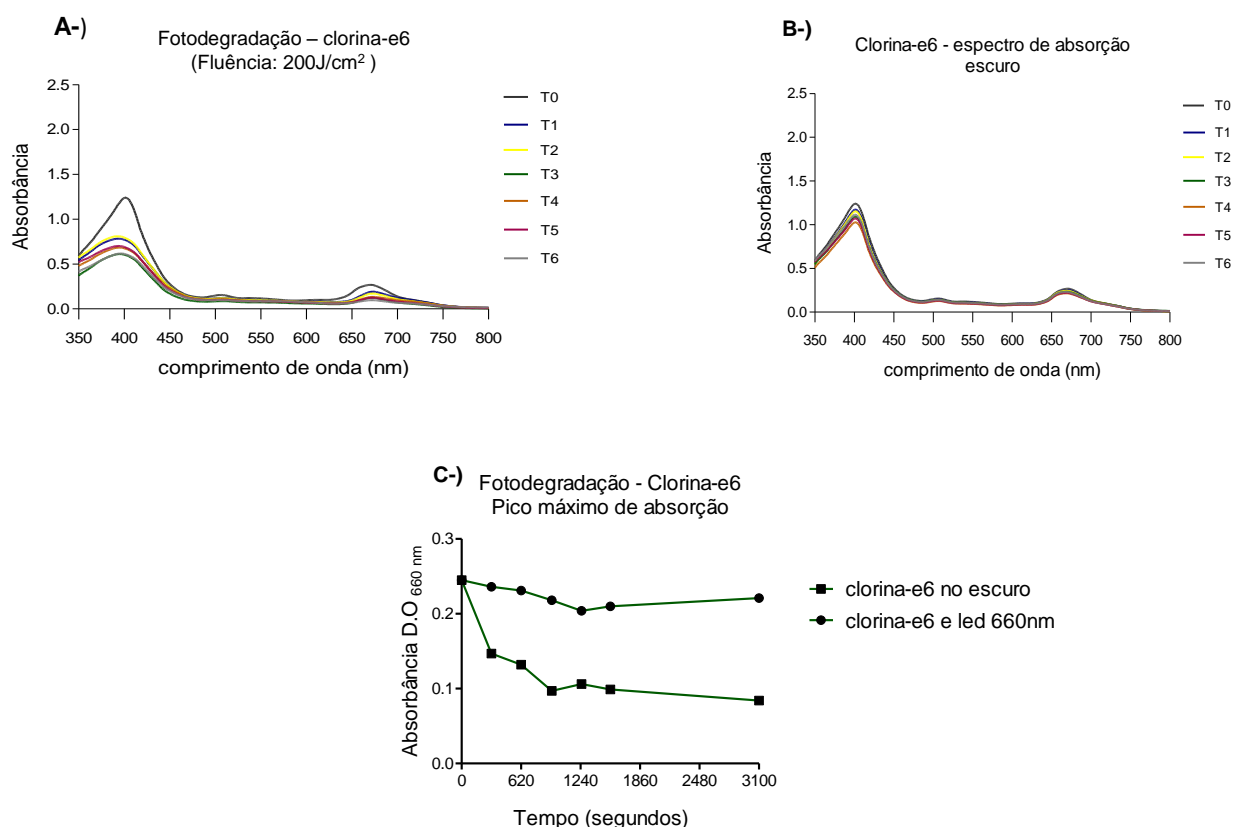


Figura 10. Avaliação da cinética de fotodegradação da clorina-e6. A: fotodegradação da clorina-e6 na concentração de 75 µg/mL. B: Cinética de fotodegradação do azul de metileno na ausência de luz C: pico máximo da fotodegradação do azul de metileno em 660 nm (n=9). (Teste t, $p < 0,0001$). T0: 0 seg.; T1:310 seg.; T2: 620 seg.; T3: 932 seg.; T4:1240 seg.; T5:1550 seg.; T6: 3100 seg.

4.2.3. Internalização dos fotossensibilizadores nas amostras de biofilme através da técnica de Microscopia de fluorescência Confocal

A permeação e a internalização dos fotossensibilizadores nos microrganismos organizados em biofilmes é de grande importância para que as ocorra sensibilização dos microrganismos e a terapia fotodinâmica presente

efeito, impedindo a prevalência de células persistentes (HONRAET; ROSSEL; COENYE, 2014).

A partir da realização do ensaio de MFC para avaliar a internalização dos fotossensibilizadores utilizando diferentes tempos de pré-irradiação foi possível observar que, os três fotossensibilizadores foram capazes de permear os biofilmes até uma espessura de $50 \pm 2\mu\text{m}$. No entanto, houve diferença no tempo da internalização dos três FSs estudados, possivelmente devido às propriedades químicas distintas dessas três moléculas.

Nos ensaios utilizando a curcumina, é possível observar nas imagens (figura 11) e nos resultados de quantificação, um aumento gradual da fluorescência emitida com o aumento do tempo. Porém, não houve diferença estatística entre os tempos de 5 e 10 minutos. Dessa forma, os dados sugerem que o tempo de 30 minutos de pré-irradiação (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey, $p < 0,001$) seria necessário para uma maior internalização desse FS pelos microrganismos organizados no biofilme acneico (figura 14). Esses resultados corroboram com o estudo de Andrade *et al.*, (2013), em que os autores analisaram a internalização de CUR em biofilmes de *Candida* e observaram através de imagens obtidas por MFC maior fluorescência após 20 minutos de incubação quando comparado ao tempo de 5 minutos, sugerindo que a penetração da CUR nas células do biofilme após 20 minutos pode ter alcançado valores maiores.

Utilizando o azul de metileno como FS, foi possível observar visualmente através da coloração das imagens obtidas (figura 12) e nos resultados de quantificação da emissão de fluorescência (figura 15) que não houve diferença estatística na internalização desse FS pelos microrganismos nos diferentes tempos avaliados. Sendo assim, de acordo com os dados, 1 minuto de pré-irradiação seria o suficiente para esse FS ser internalizado nas amostras desse biofilme.

Quanto a internalização da clorina-e6 (figura 13), os resultados relevaram que os tempos 1 e 5 minutos foram estatisticamente semelhantes e diferentes dos tempos 10, 15 e 30 minutos. Entre estes últimos, não houve diferença estatística. Portanto, esses resultados indicaram que entre os tempos avaliados, o tempo de 10 minutos poderia ser utilizado como tempo de pré-irradiação (figura 16).

Considerando que o biofilme é um ambiente altamente hidratado que protege as células das flutuações do potencial hídrico e que a CUR e a Ce6 possuem características hidrofóbicas, é possível que esses FSs agreguem quando entram em contato com a água presente na matriz extracelular, dificultando a internalização (HUANG *et al.*, 2010; PINTO *et al.*, 2020). O AM ao contrário, possui uma estrutura básica com propriedades hidrofílicas (TARDIVO *et al.*, 2005), o que pode justificar a rápida internalização desse FS nas amostras dos biofilmes acneicos.

Dessa forma, os resultados desse estudo sugerem que o tempo de internalização dos FSs nas amostras de biofilmes depende das propriedades distintas de cada molécula. No caso de FSs fenotiazínicos, como o AM, o tempo de internalização pode ser mais curto. No entanto, a CUR e a Ce6, podem necessitar de tempos maiores.

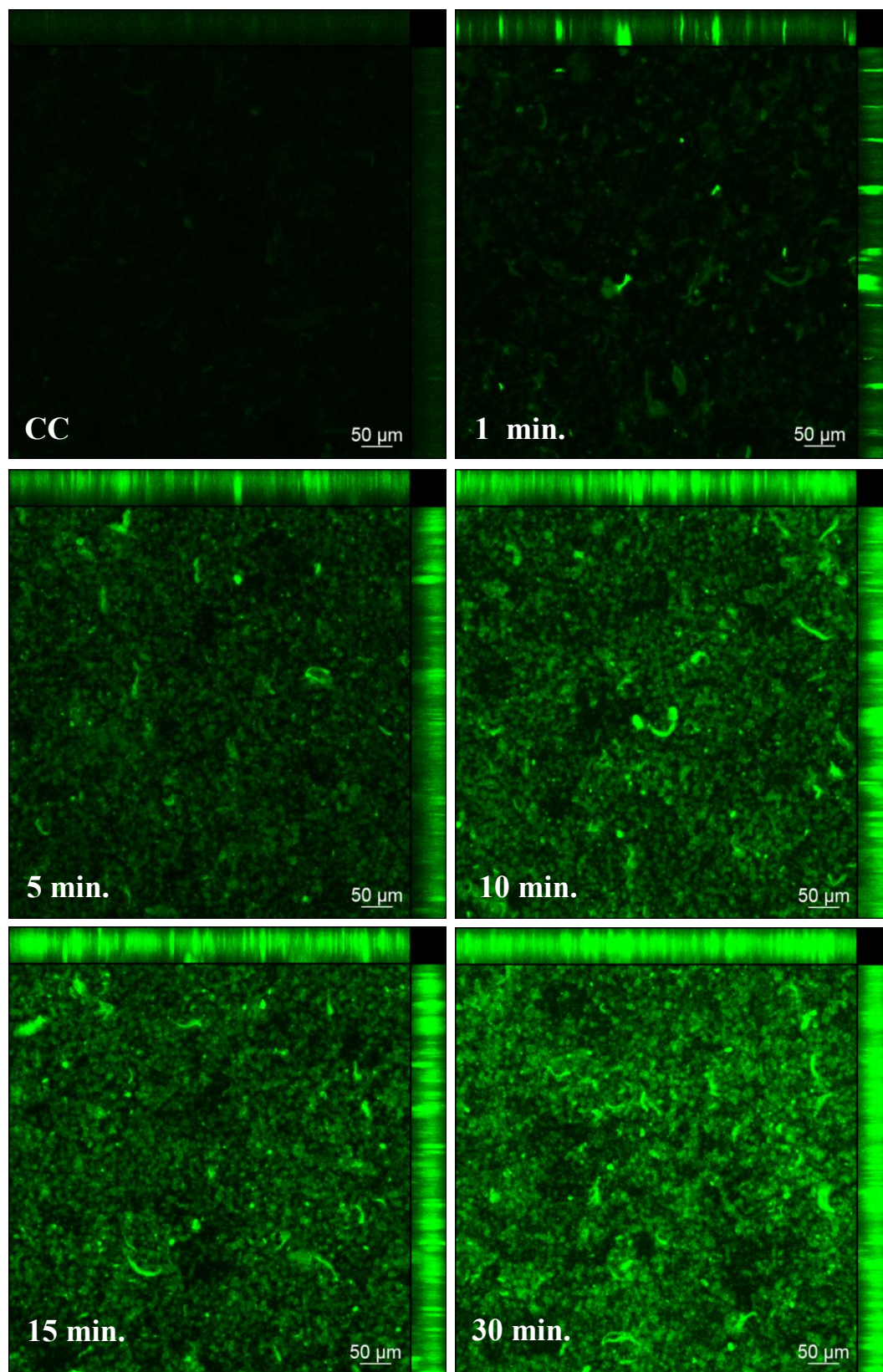


Figura 11. Internalização da curcumina ($75\ \mu\text{g/mL}$) nos tempos de pré-irradiação de 1,5, 10, 15 e 30 minutos. Marcações em verde indicam a internalização da curcumina.

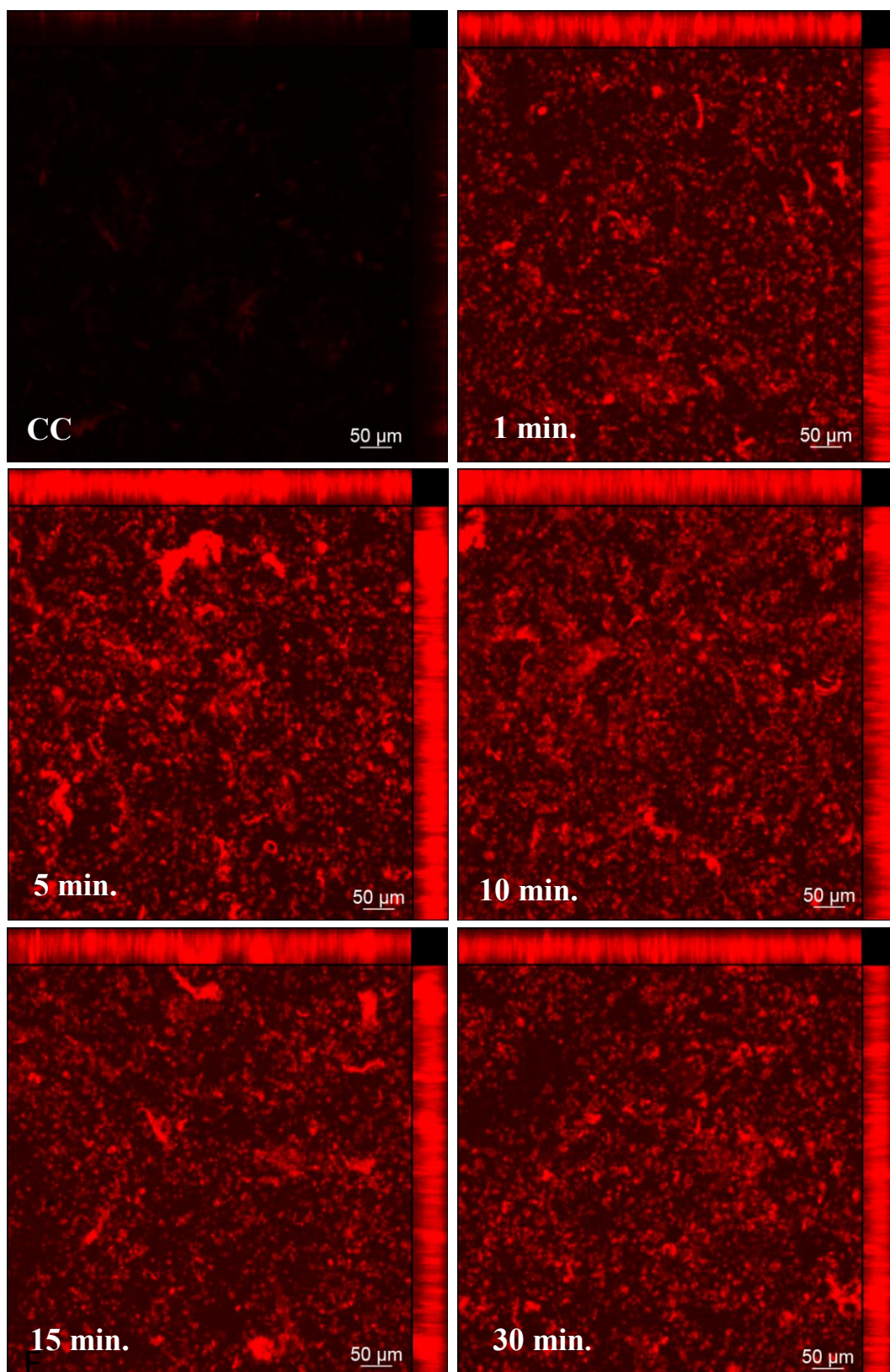


Figura 12. Internalização do azul de metileno (7.5 µg/mL) nos tempos de pré-irradiação de 1,5, 10, 15 e 30 minutos. Marcações em vermelho indicam a internalização do azul de metileno.

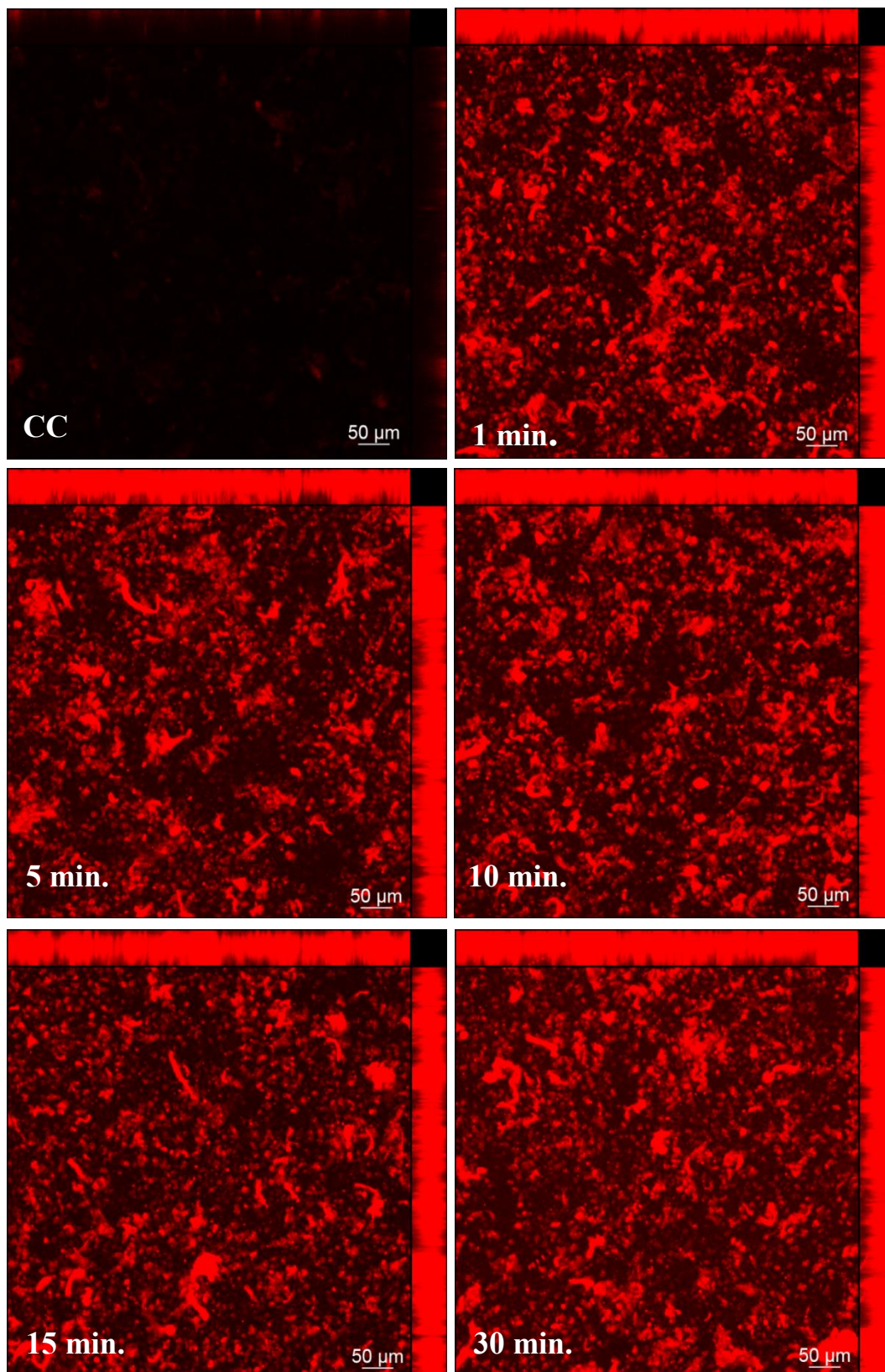


Figura 13. Internalização da clorina-6 (75 µg/mL) nos tempos de pré-irradiação de 1, 5, 10, 15 e 30 minutos. Marcações em vermelho indicam a internalização da clorina-6.

Internalização da curcumina em biofilmes acneicos

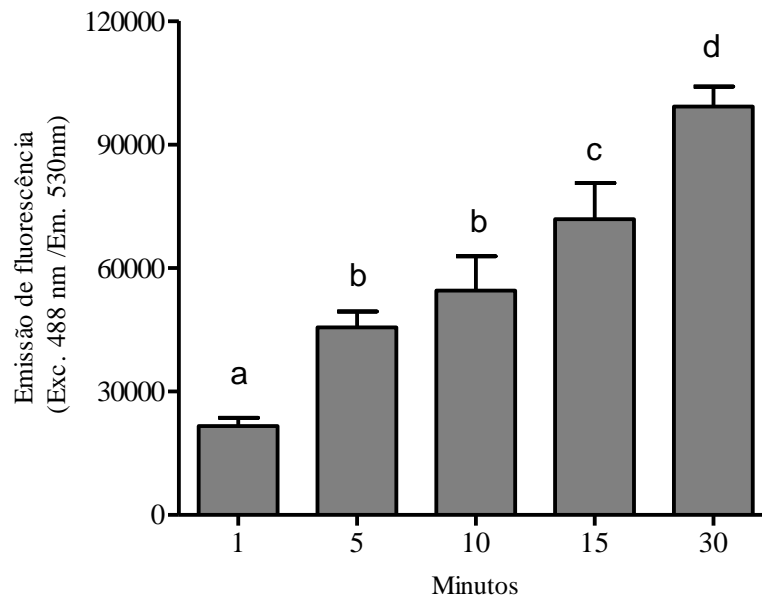


Figura 14. Quantificação da emissão de fluorescência da curcumina. As colunas representam os valores médios de emissão de fluorescência. As barras representam o desvio-padrão (n=6). Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tempos (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey).

Internalização do azul de metileno em biofilmes acneicos

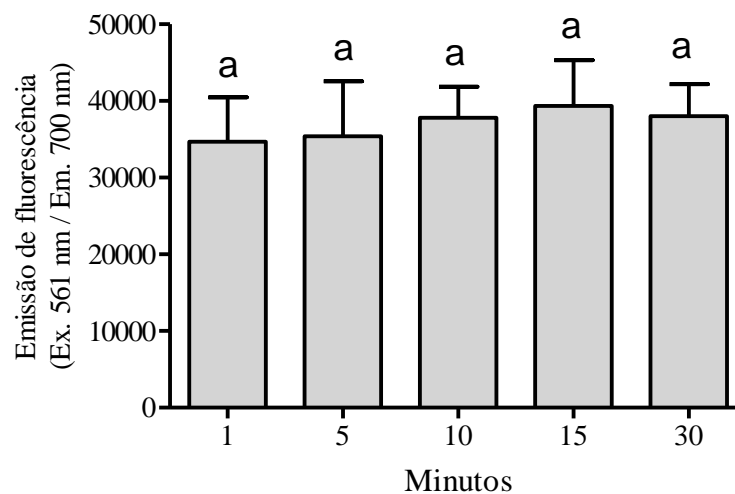


Figura 15. Quantificação da emissão de fluorescência do azul de metileno. As colunas representam os valores médios de emissão de fluorescência. As barras representam o desvio-padrão (n=6). Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tempos (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey).

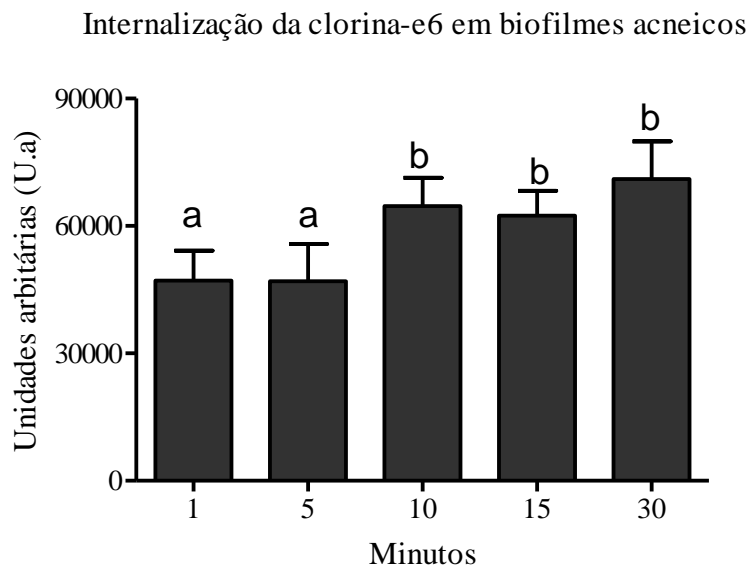


Figura 16. Quantificação da emissão de fluorescência da clorina-e6. As colunas representam os valores médios de emissão de fluorescência. As barras representam o desvio-padrão (n=6). Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tempos (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey).

4.2.4. Viabilidade celular dos biofilmes polimicrobianos após tratamento fotodinâmico (UFC/mL)

A partir dos resultados aplicando o LED 460 nm nas fluências de 75, 100, 150 e 200 J/cm² foi possível alcançar reduções de 1,60; 2,85; 4,10 e 5,11 log₁₀ respectivamente. Quando aplicada a fluência de 50 J/cm², não houve redução na contagem de UFC/mL (figura 17).

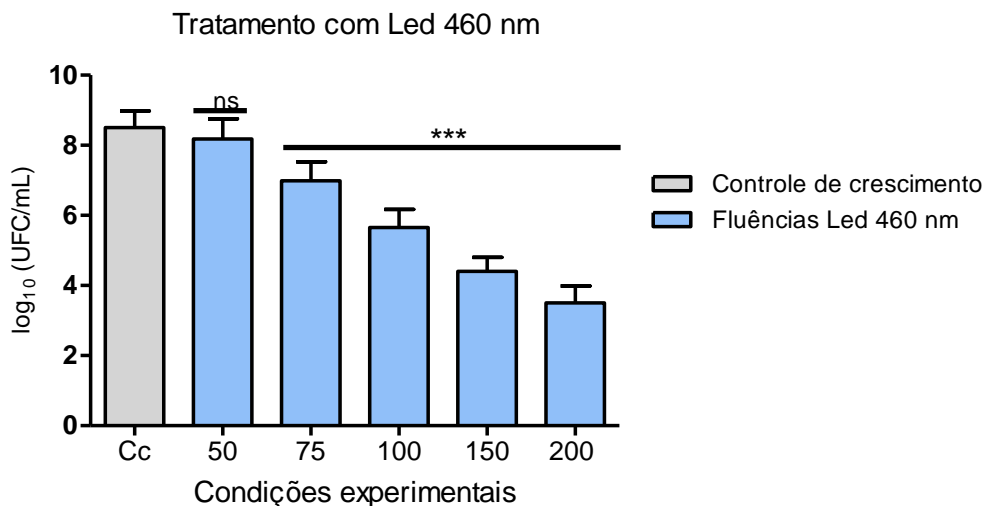


Figura 17. Análise de unidades formadoras de colônias após irradiação com diferentes fluências de Led 460 nm. Valores médios de log₁₀ entre os grupos avaliados. As colunas representam os valores médios de redução e as barras representam o desvio-padrão (n=9). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). ***p<0,001; ns: não significativo.

Nos ensaios aplicando as fluências de 75, 100, 150 e 200 J/cm² do LED 660 nm não foi observada redução na contagem de UFC/mL em nenhuma das fluências utilizadas (figura 18).

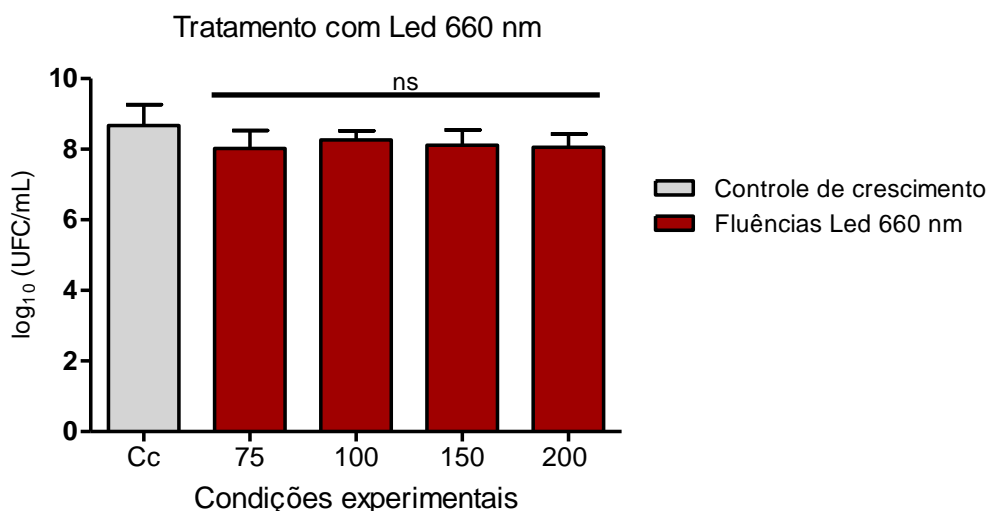


Figura 18. Análise de unidades formadoras de colônias após diferentes fluências Led 660 nm. Valores médios de log₁₀ entre os grupos avaliados. As colunas representam os valores médios de redução e as barras representam o desvio-padrão (n=9). (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). ns: não significativo.

A redução na contagem de UFC/mL após os tratamentos com a luz 460 nm (figura 17) pode ser justificada, pois *C. acnes* sintetiza principalmente protoporfirina e coproporfirina que, ao absorverem a energia da luz ao redor dos 400 nm formam EROs capazes de causar a morte da bactéria (PASCHOAL; ISMAEL, 2010). Desse modo, foi possível verificar que as altas fluências utilizadas foram capazes de excitar as porfirinas endógenas da bactéria.

Um estudo realizado por Ashkenazi *et al.*, (2003) referente à fotoinativação de *C. acnes* utilizando apenas luz azul revelou que fluências a partir de 75 J/cm² podem inativar a bactéria cultivada em meio líquido, o que justifica não ter sido observada redução na contagem de colônias quando utilizada a fluência de 50 J/cm². Além disso, os autores demonstraram que a coproporfirina é o produto principal dos cromóforos endógenos produzidos pela bactéria, que aumenta em função do seu tempo de crescimento em até 96 horas de cultivo, se acumulando no interior de *C. acnes*. Dessa forma, quanto maior a quantidade intracelular de porfirina, melhores são os resultados de erradicação (ASHKENAZI *et al.*, 2003).

A fotoinativação de *C. acnes* pela luz azul ocorre pela coproporfirina, a principal porfirina produzida pela bactéria, através do efluxo de potássio das células microbianas e da perda significativa de fosfato, como consequência do dano oxidativo à membrana plasmática e as suas bombas iônicas devido a ação das EROs formadas pela excitação da coproporfirina (ASHKENAZI *et al.*, 2003). O dano no microrganismo também ocorre pelas perturbações no influxo transmembrana de proteínas, devido às alterações no pH intracelular da bactéria induzidas pela irradiação (PASCHOAL; ISMAEL, 2010). Considerando que a faixa de excitação da coproporfirina encontra-se em torno de 400 nm, justifica-se a irradiação com fonte de 660 nm não ter apresentado redução na contagem de UFC/mL mesmo com altas fluências.

Os resultados obtidos com uma aplicação *in vitro* da TFD mediada por curcumina em biofilmes acneicos proporcionou uma redução de 2,16; 3,11 e 4,79 log₁₀ quando combinada com a curcumina nas respectivas concentrações: 75, 100 e 150 µg/mL. No entanto, não houve diferença estatística entre as concentrações de 75 e 100 µg/mL de curcumina (figura 19).

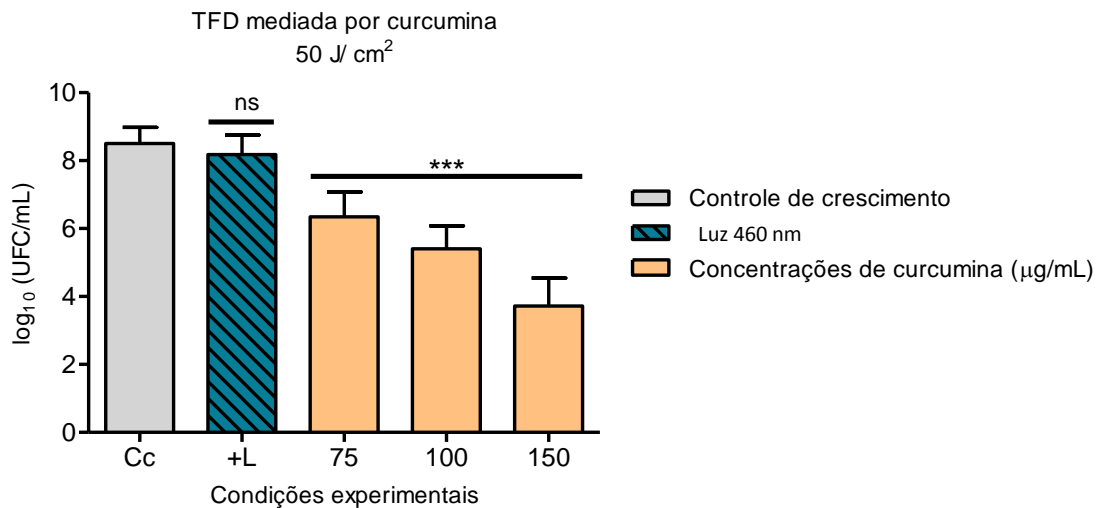


Figura 19. Análise de unidades formadoras de colônias após aplicação de TFD mediada por curcumina. Valores médios de log₁₀ entre os grupos avaliados. As colunas representam os valores médios de redução e as barras representam o desvio-padrão (n=9). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). ***p<0,001; ns: não significativo.

Os testes para avaliar a toxicidade da curcumina no escuro, revelaram que nas concentrações testadas não houve redução microbiana na ausência de luz. Além disso, a solução de sacarose 0,5% também não apresentou efeito citotóxico para as células do biofilme (figura 20). Apesar desse FS apresentar limitações como baixa solubilidade e rápida fotodegradação, foi possível alcançar reduções significativas na contagem de UFC/mL utilizando a fluência de 50 J/cm².

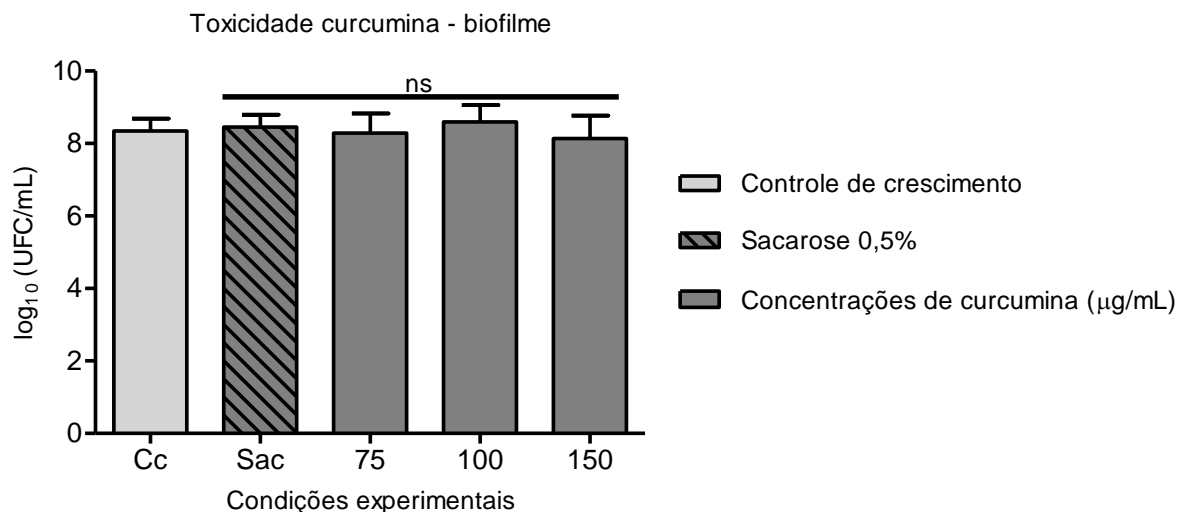


Figura 20. Análise de unidades formadoras de colônias após tratamento com a curcumina no escuro. Valores médios de log₁₀ entre os grupos avaliados. As colunas representam os valores médios de redução e as barras representam o desvio-padrão (n=9) (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). ns: não significativo.

A aplicação da TFD associada ao LED vermelho, mediada por azul de metileno nas concentrações de 75, 100 e 150 µg/mL resultou na redução de 1,68; 3,10 e 4,45 log₁₀ respectivamente (figura 21). Além disso, o FS na ausência de luz não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações testadas (figura 22).

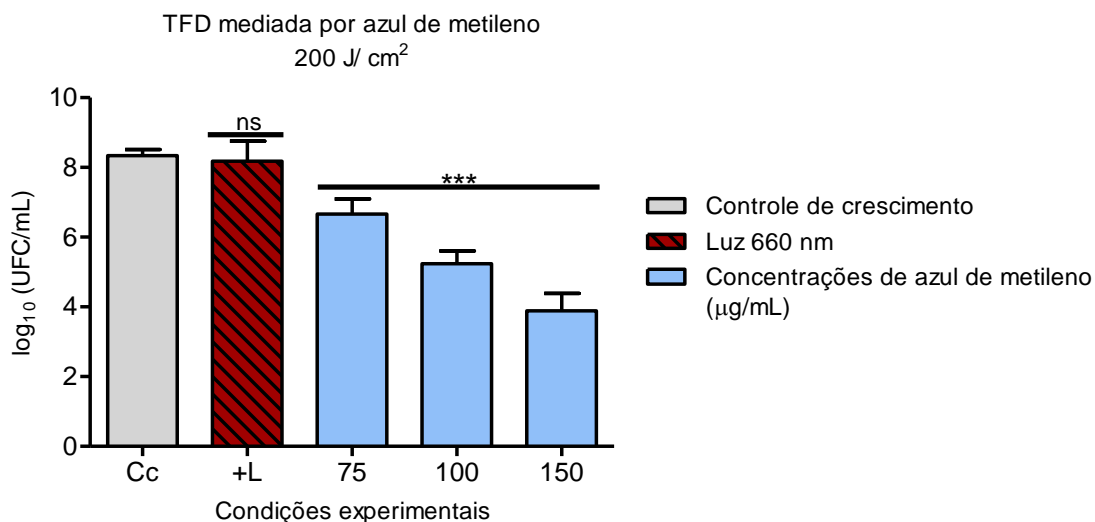


Figura 21. Análise de unidades formadoras de colônias após aplicação de TFD mediada por azul de metileno. As colunas representam os valores médios de redução e as barras representam o desvio-padrão (n=9). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). ***p<0,001; ns: não significativo.

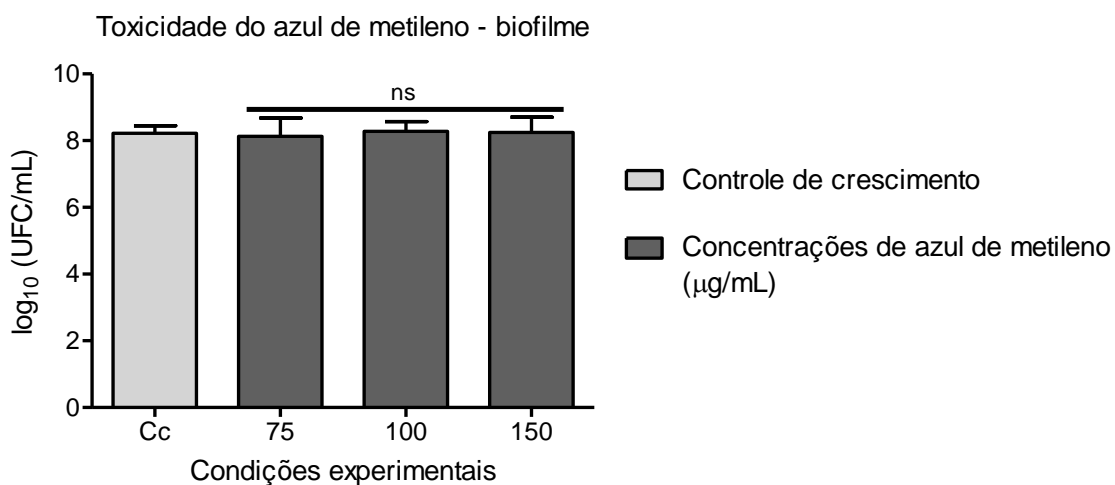


Figura 22. Análise de unidades formadoras de colônias após tratamento com azul de metileno no escuro. As colunas representam os valores médios de redução e as barras representam o desvio-padrão (n=9). (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). ns: não significativo.

Os resultados obtidos com uma aplicação *in vitro* da TFD mediada por clorina-e6 em biofilmes acneicos proporcionou uma redução de 1,72; 2,51 e 3,28 log₁₀ quando utilizadas as concentrações de 75, 100 e 150 µg/mL

respectivamente (figura 23). As concentrações de 100 e 150 $\mu\text{g/mL}$ não apresentaram diferença estatística.

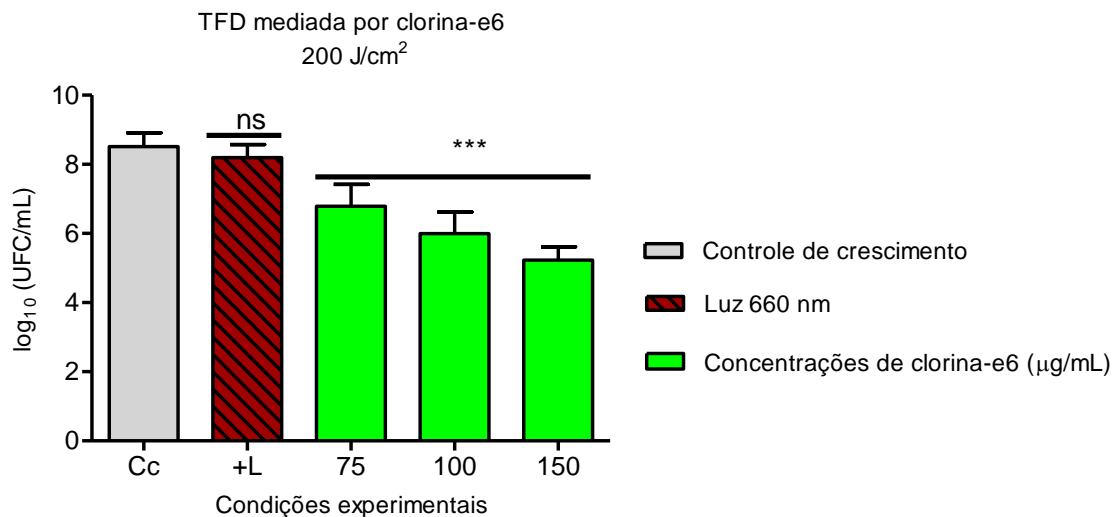


Figura 23. Análise de unidades formadoras de colônias após aplicação de TFD mediada por clorina-e6. Valores médios de log₁₀ entre os grupos avaliados. As colunas representam os valores médios de redução e as barras representam o desvio-padrão (n=9). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). ***p<0,001; ns: não significativo.

Quanto aos ensaios realizados na ausência de luz, as concentrações de clorina-e6 não apresentaram atividade antimicrobiana, bem como o controle de veículo (DMSO 1%) (figura 24).

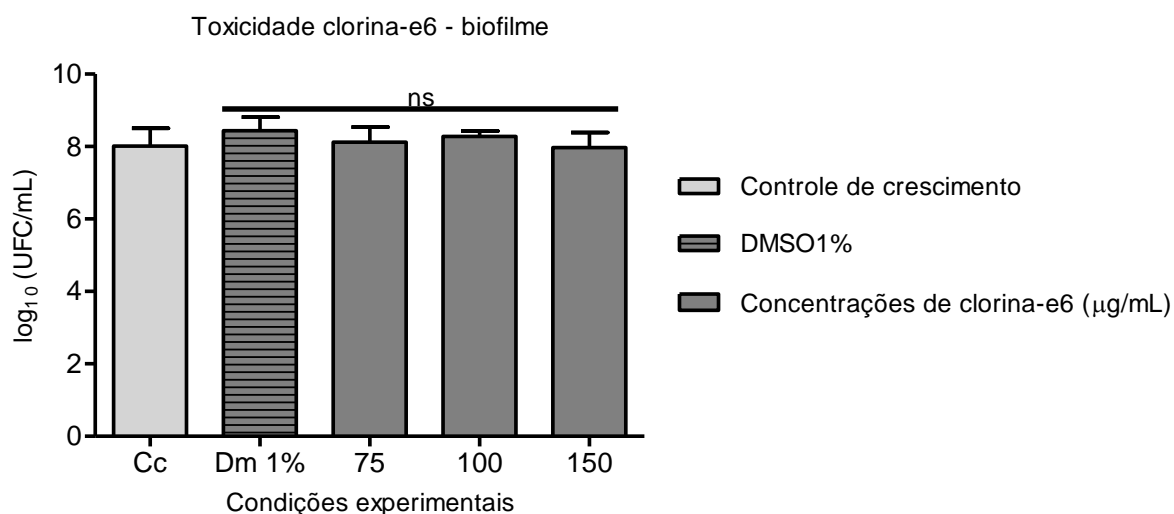


Figura 24. Análise de unidades formadoras de colônias após tratamento com clorina-e6 no escuro. As colunas representam os valores médios de redução e as barras representam o desvio-padrão (n=9). (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). ns: não significativo.

Os resultados utilizando a CUR, Ce6 e AM mostram que a TFD mediada a essas três moléculas foi capaz de reduzir mais de 3 log₁₀ utilizando 100 µg/mL da CUR e do AM e 150 µg/mL da Ce6. Nos três ensaios, foi verificada uma redução dependente da concentração do FS. Resultados semelhantes foram observados por Zago *et al.*, (2020), utilizando esses mesmos FSs, em um modelo de biofilme formado por periodontopatógenos.

É importante mencionar que, nenhum FS apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações testadas. Esse resultado está de acordo com um dos critérios necessários para a utilização de FSs na TFD: o mesmo deve ter pouca ou nenhuma atividade na ausência de luz (NAGATA *et al.*, 2012).

De acordo com a Sociedade Americana de Microbiologia, qualquer novo protocolo de intervenção em terapias bactericidas deve atingir pelo menos uma redução de 3 log₁₀ de UFC para ser considerado antimicrobiano (ALVES *et al.*, 2014). Sendo assim, embora uma aplicação não tenha erradicado totalmente as células no biofilme, a TFD mediada pelos três FSs foi capaz de reduzir pelo menos 3 log₁₀ na contagem de UFC, podendo ser considerado um tratamento antimicrobiano.

4.2.5. Avaliação da viabilidade das células do biofilme após aplicações consecutivas de terapia fotodinâmica

Um aspecto importante que tem sido relacionado à TFD na aplicação em biofilmes é a possibilidade dessa terapia perturbar a estrutura diminuindo a biomassa dos biofilmes, podendo torna-lo mais suscetível às aplicações consecutivas (GOULART *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2011).

Para a realização das aplicações consecutivas, a menor concentração testada (75 µg/mL) foi utilizada para os ensaios com os três fotossensibilizadores estudados, a fim de verificar se um parâmetro que reduzisse valores inferiores de 3 log₁₀ na viabilidade das células no biofilme,

poderia apresentar reduções superiores após mais de uma aplicação. Além disso, foi mantida a mesma fluência de luz em todas as aplicações.

Dessa forma, no ensaio de TFD mediada por curcumina na concentração de 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi possível observar uma redução de 2,04 \log_{10} após uma aplicação. A luz aplicada isoladamente como controle, bem como o FS na ausência de luz e o veículo utilizado para solubilizar a curcumina não reduziu a viabilidade das células do biofilme (figura 25).

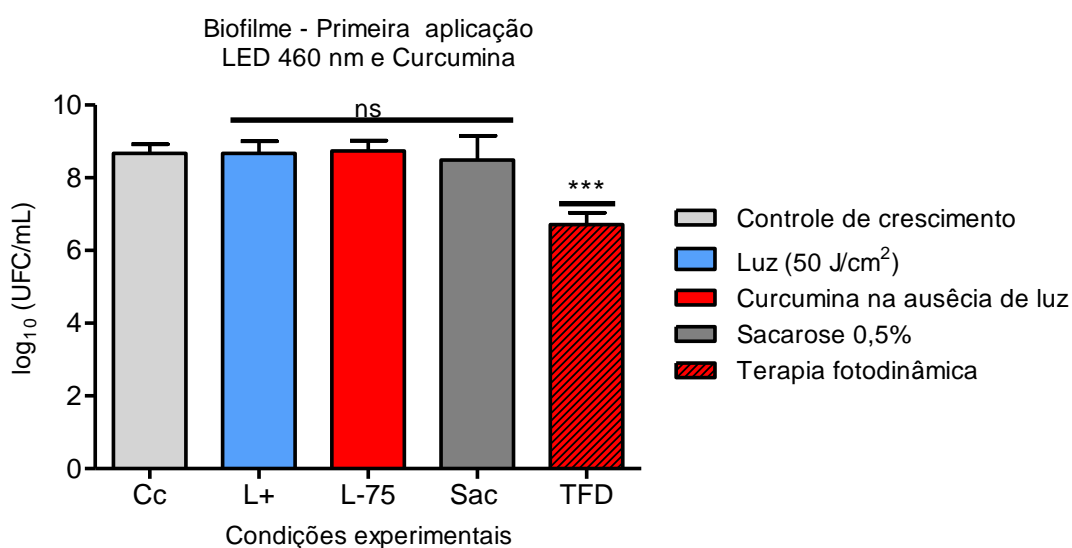


Figura 25. Análise de unidades formadoras de colônias após uma aplicação de TFD mediada por curcumina. Valores médios de \log_{10} entre os grupos avaliados. As colunas representam os valores médios de redução e as barras representam o desvio-padrão (n=9). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). ***p<0,001; ns: não significativo.

Quando aplicada a segunda, terceira e quarta aplicação da TFD mediada por curcumina, reduções semelhantes foram observadas, nos valores de 3,94; 4,02 e 3,95 \log_{10} , respectivamente. A luz isoladamente, a curcumina e a solução de sacarose 0,5% não tiveram efeito sobre a viabilidade celular mesmo após quatro aplicações (figuras 26, 27 e 28).

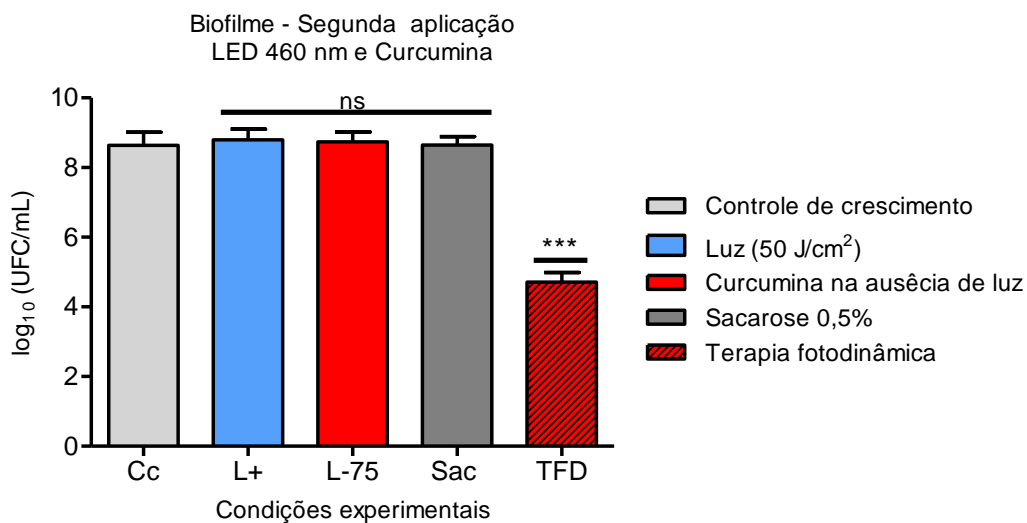


Figura 26. Análise de unidades formadoras de colônias após duas aplicações de TFD mediada por curcumina. Valores médios de log₁₀ entre os grupos avaliados. As colunas representam os valores médios de redução e as barras representam o desvio-padrão (n=9). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). ***p<0,001; ns: não significativo.

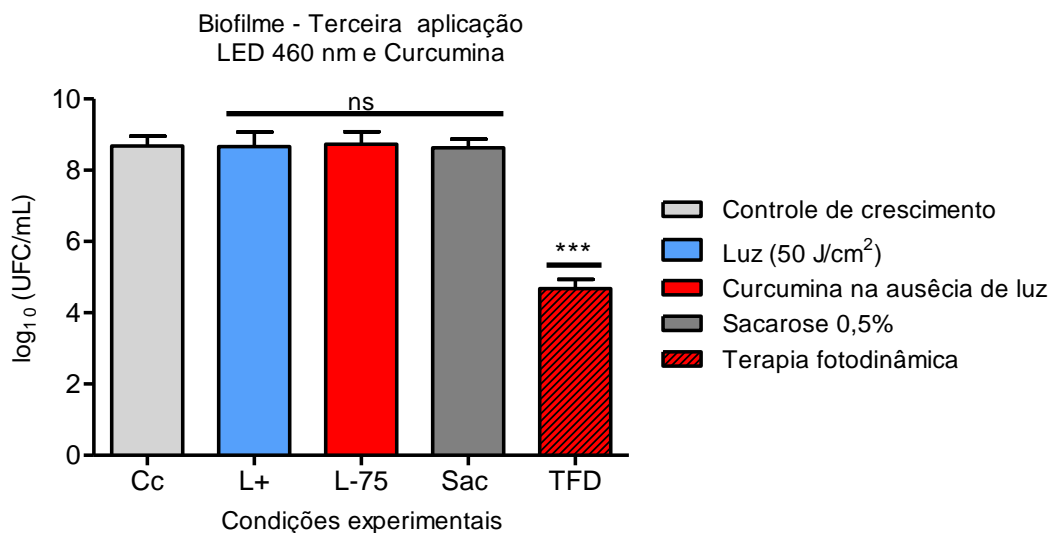


Figura 27. Análise de unidades formadoras de colônias após três aplicações de TFD mediada por curcumina. Valores médios de log₁₀ entre os grupos avaliados. As colunas representam os valores médios de redução e as barras representam o desvio-padrão (n=9). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). ***p<0,001; ns: não significativo.

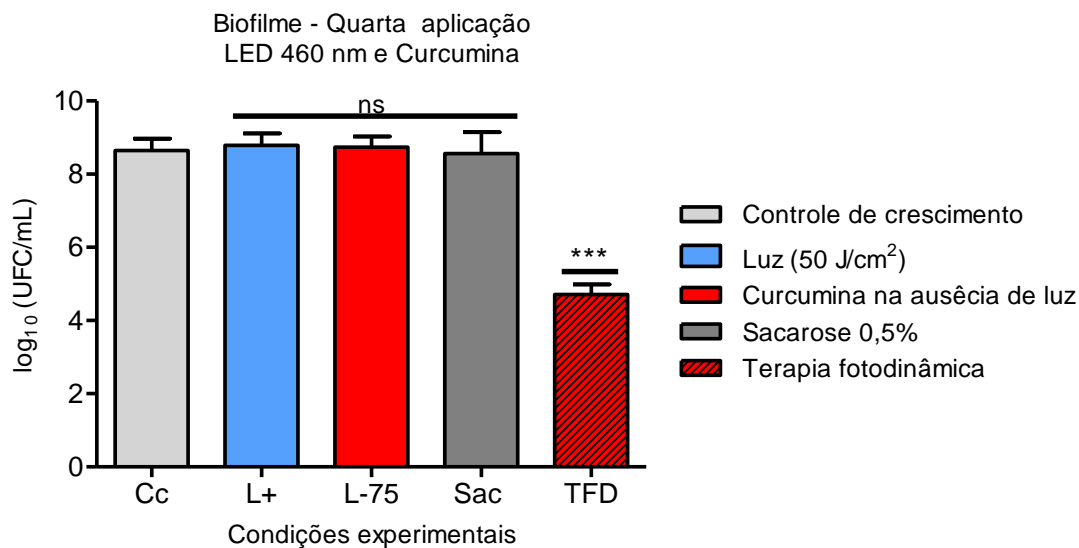


Figura 28. Análise de unidades formadoras de colônias após quatro aplicações de TFD mediada por curcumina. Valores médios de log₁₀ entre os grupos avaliados. As colunas representam os valores médios de redução e as barras representam o desvio-padrão (n=9). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). ***p<0,001; ns: não significativo.

Os resultados obtidos com as aplicações consecutivas de TFD mediada por azul de metileno são bastante promissores. A primeira aplicação resultou na redução de 1,96 log₁₀ (figura 29), a segunda aplicação possibilitou uma redução maior, no valor de 6,65 log₁₀ (figura 30). Quando realizada a terceira aplicação, foi possível reduzir totalmente a viabilidade das células do biofilme acneico (figura 31). Dessa forma, não foi necessário realizar uma quarta aplicação. Para as três aplicações não foram verificadas reduções na viabilidade celular nos grupos luz e azul de metileno no escuro (figuras 29, 30 e 31).

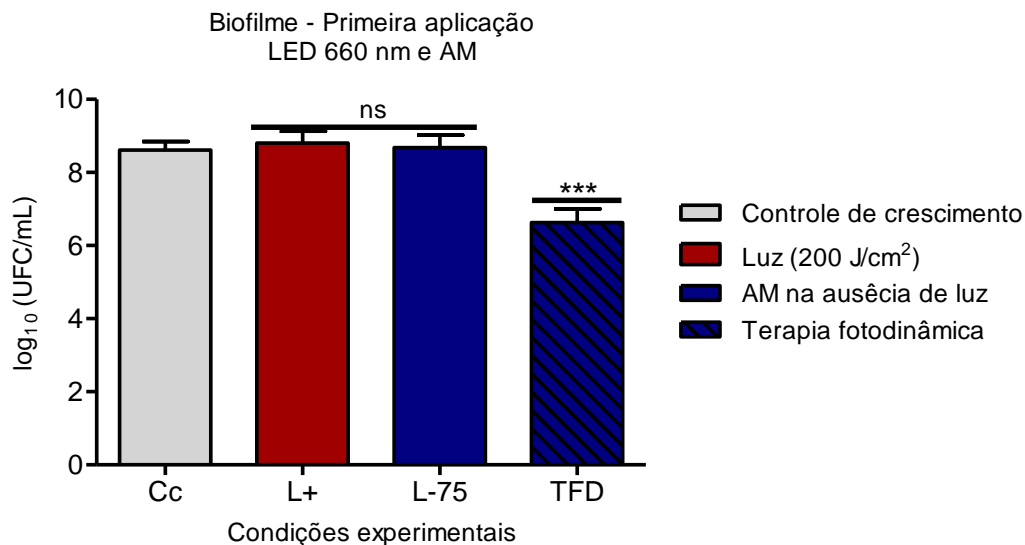


Figura 29. Análise de unidades formadoras de colônias após uma aplicação de TFD mediada por azul de metileno. Valores médios de log₁₀ entre os grupos avaliados. As colunas representam os valores médios de redução e as barras representam o desvio-padrão (n=9). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). ***p<0,001; ns: não significativo.

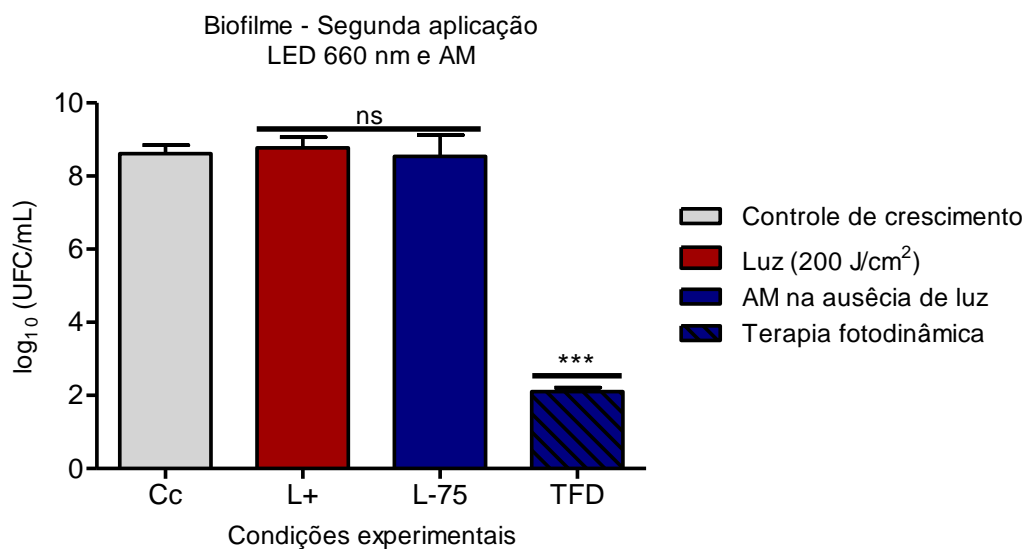


Figura 30. Análise de unidades formadoras de colônias após duas aplicações de TFD mediada por azul de metileno. Valores médios de log₁₀ entre os grupos avaliados. As colunas representam os valores médios de redução e as barras representam o desvio-padrão (n=9). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). ***p<0,001; ns: não significativo.

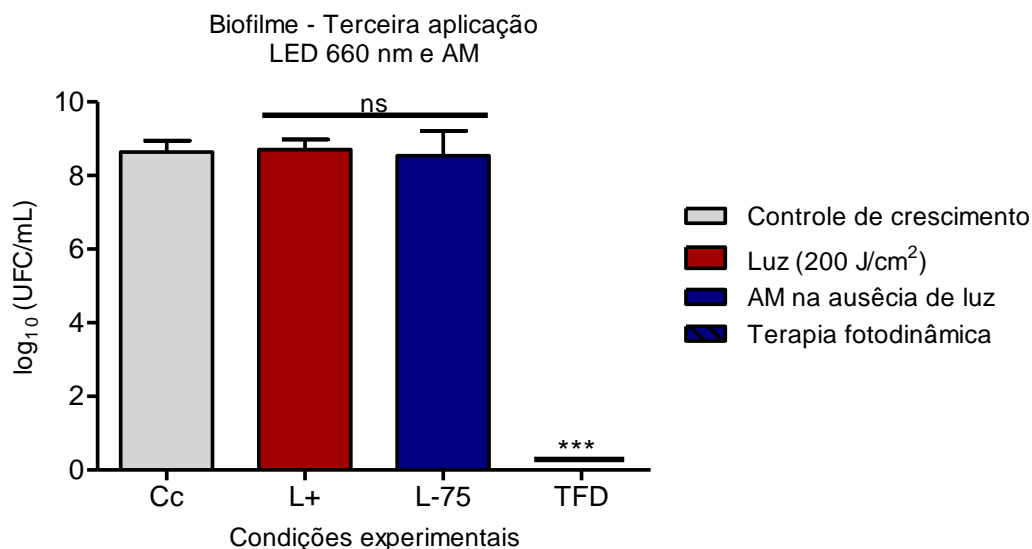


Figura 31. Análise de unidades formadoras de colônias após três aplicações de TFD mediada por azul de metileno. Valores médios de log₁₀ entre os grupos avaliados. As colunas representam os valores médios de redução e as barras representam o desvio-padrão (n=9). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). ***p<0,001; ns: não significativo.

Os resultados obtidos com as aplicações consecutivas de TFD mediada por clorina-e6 são semelhantes aos resultados observados nos ensaios com curcumina, onde foi alcançada uma pequena redução após uma aplicação, e reduções maiores, porém, parecidas entre as aplicações dois, três e quatro. A primeira aplicação resultou na redução de 1,88 log₁₀ (figura 32), a segunda, terceira e quarta aplicação possibilitaram reduções no valor de 3,83; 4,05 e 4,25 log₁₀ respectivamente (figura 33, 34 e 35). Os grupos controle de luz, clorina-e6 no escuro e controle de veículo (Dms0 1%) não apresentaram reduções na viabilidade celular mesmo após quatro tratamentos (figuras 32, 33, 34 e 35).

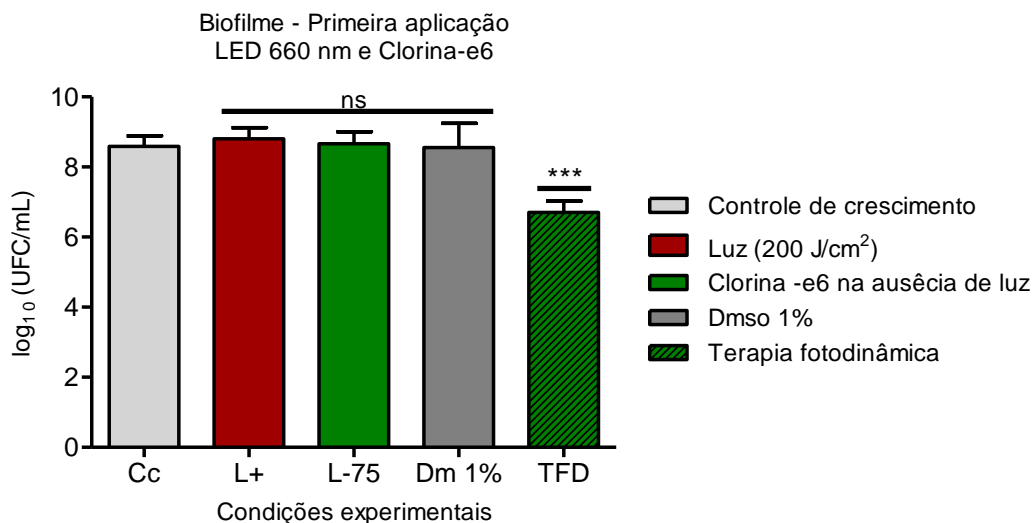


Figura 32. Análise de unidades formadoras de colônias após uma aplicação de TFD mediada por clorina-e6. Valores médios de \log_{10} entre os grupos avaliados. As colunas representam os valores médios de redução e as barras representam o desvio-padrão (n=9). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). ***p<0,001; ns: não significativo.

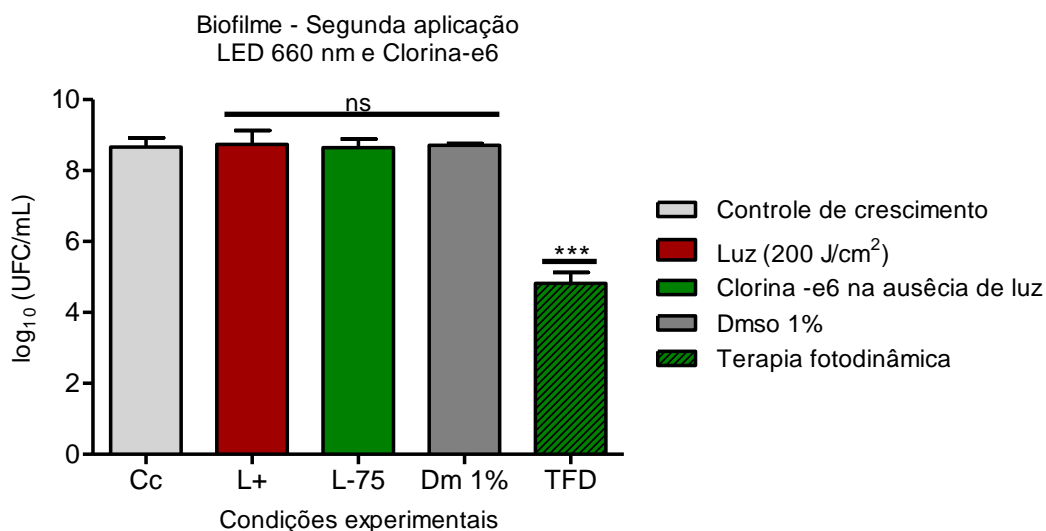


Figura 33. Análise de unidades formadoras de colônias após duas aplicações de TFD mediada por clorina-e6. Valores médios de \log_{10} entre os grupos avaliados. As colunas representam os valores médios de redução e as barras representam o desvio-padrão (n=9). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). ***p<0,001; ns: não significativo.

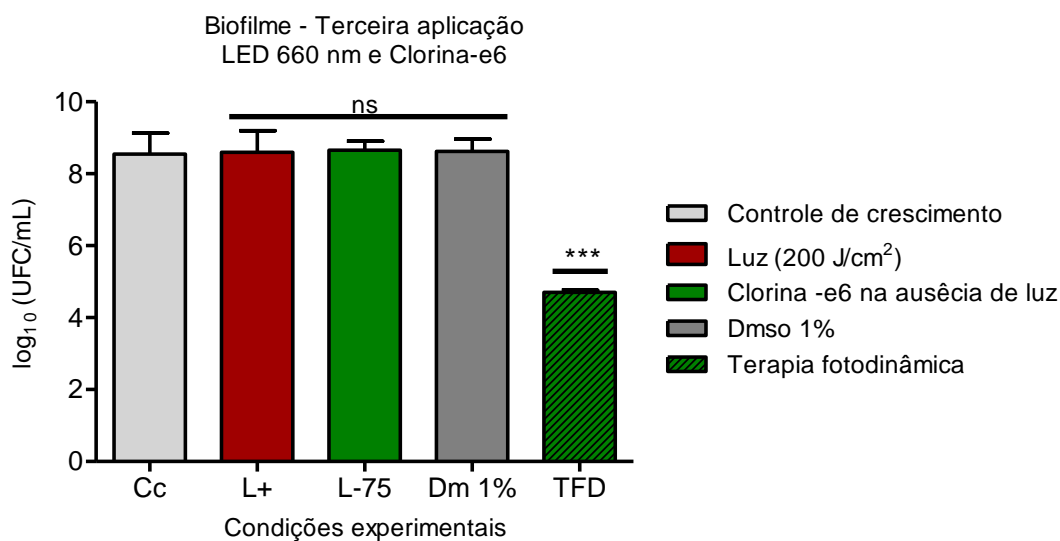


Figura 34. Análise de unidades formadoras de colônias após três aplicações de TFD mediada por clorina-e6. Valores médios de log₁₀ entre os grupos avaliados. As colunas representam os valores médios de redução e as barras representam o desvio-padrão (n=9). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). ***p<0,001; ns: não significativo.

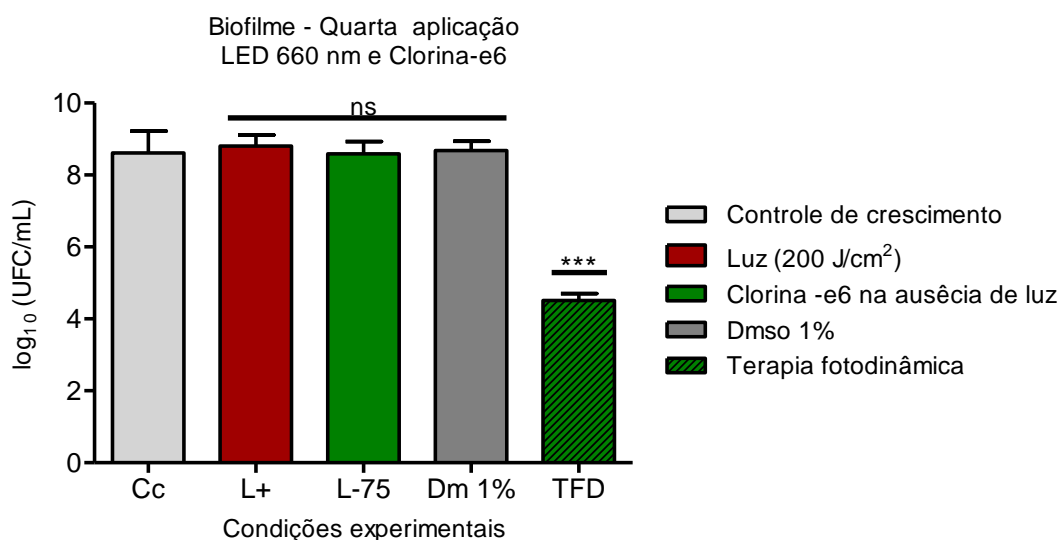


Figura 35. Análise de unidades formadoras de colônias após quatro aplicações de TFD mediada por clorina-e6. Valores médios de log₁₀ entre os grupos avaliados. As colunas representam os valores médios de redução e as barras representam o desvio-padrão (n=9). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). ***p<0,001; ns: não significativo.

Em uma revisão bibliográfica realizada por Boen *et al.*, (2017) os autores concluíram que a maioria dos estudos clínicos realizaram de uma a quatro aplicações de TFD mediada por MAL e ALA para o tratamento da acne. Por

essa razão, os ensaios do presente estudo foram delineados para que fosse realizada uma aplicação diária, durante quatro dias nas amostras de biofilmes. Como mencionado anteriormente, as amostras tratadas com TFD mediada por AM foram totalmente inativadas com três aplicações, por isso, não foi necessário realizar uma quarta aplicação para esse tratamento.

Estudos utilizando CUR, AM e Ce6 para aplicações consecutivas em modelo de biofilmes acneicos ainda não são descritos na literatura. Quishida *et al.*, (2015), realizaram três aplicações sucessivas da TFD mediada por Photodithazine® e LED 660 nm contra um biofilme multiespécies formado por *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Streptococcus mutans* em resina acrílica e verificaram que três aplicações apresentaram maior eficiência na redução da viabilidade celular e biomassa total do biofilme. Um estudo realizado por Luke-Marshall *et al.*, (2020) demonstrou que duas aplicações inibiu efetivamente biofilmes de otopatógenos formado por *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, e *Haemophilus influenzae* utilizando Ce6 e LED 405.

Investigações clínicas anteriores, demonstraram a necessidade de mais de uma aplicação de ALA e MAL para o tratamento de pacientes com acne vulgar (BOEN *et al.*, 2017). No entanto, como mencionado anteriormente, esses fármacos necessitam de longos tempos de pré-irradiação. Nesse contexto, FSs com melhores propriedades físico-químicas podem reduzir o tempo de aplicação na prática clínica. Diante do exposto até o momento, o presente estudo corrobora com a literatura, tendo em vista que para os três FSs houve uma maior redução a partir de uma segunda aplicação. No entanto, o aumento da redução a partir das próximas aplicações pode ser dependente do FS utilizado.

4.2.6. Avaliação do dano dos componentes proteicos da matriz do biofilme após os tratamentos fotodinâmicos

A matriz polimérica extracelular representa aproximadamente 90% da biomassa total do biofilme e pode atuar como uma barreira física de proteção para as células. Sua espessura e composição química podem impedir a difusão de antimicrobianos nas camadas mais profundas dos biofilmes, pois possuem muitas moléculas aniônicas e catiônicas, como ácidos urônicos, proteínas,

glicoproteínas, glicolípídeos e DNA, que podem se ligar a antibióticos carregados, conferindo proteção para os microrganismos que compõem o biofilme, tornando essas células tolerantes aos tratamentos e no caso do tratamento fotodinâmico, pode impedir a sensibilização das células-alvo (FLEMMING; WINGER, 2010, FULAZ *et al.*, 2019).

A sonda fluorescente *Sypro Ruby Biofilm Matrix Stain* tem sido utilizada para corar os componentes proteicos da matriz de biofilmes (WU *et al.*, 2013). Este corante marca a maioria das classes de proteínas, incluindo glicoproteínas, fosfoproteínas, lipoproteínas, proteínas de ligação de cálcio, proteínas fibrilares e outras proteínas que são difíceis de corar. Nesse estudo, utilizamos esse marcador a fim de avaliarmos se os componentes proteicos da matriz polimérica extracelular dos biofilmes acneicos sofreria dano após os tratamentos fotodinâmicos.

A partir da aquisição das imagens, foi possível verificar que houve uma menor detecção de fluorescência nos grupos tratados com luz em associação com os FSs (figura 36). Enquanto que, nos grupos tratados apenas com as luzes (460 e 660 nm) e com os FSs na ausência de luz, foi detectada maior emissão de fluorescência.

A ação da TFD sobre componentes da matriz de biofilmes foi descrita também empregando outras metodologias. No estudo de Beirão *et al.*, (2014), os autores verificaram uma redução de 81% nos polissacarídeos da matriz por meio da quantificação por absorvância do teor de polissacarídeos após a aplicação da TFD em biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando porfirina (Tetra-Py+-Me) e luz branca. Em outro estudo realizado por Mang *et al.*, (2016), os autores utilizaram uma técnica de espectroscopia infravermelha para investigar a ação da TFD mediada por photofrin em biofilmes de *Fusobacterium nucleatum* utilizando laser 630 nm e sugeriram um enfraquecimento da matriz do biofilme após o tratamento.

No presente estudo, os resultados qualitativos e quantitativos obtidos após a análise de MFC sugerem que a TFD apresentou ação sobre os componentes proteicos da matriz dos biofilmes com apenas uma aplicação de TFD. Esse dano pode ter permitido uma maior permeação dos FSs nas células

do biofilme nas aplicações seguintes, tendo em vista que foi alcançada uma maior redução na contagem de colônias a partir da segunda aplicação de TFD para os três FSs utilizados.

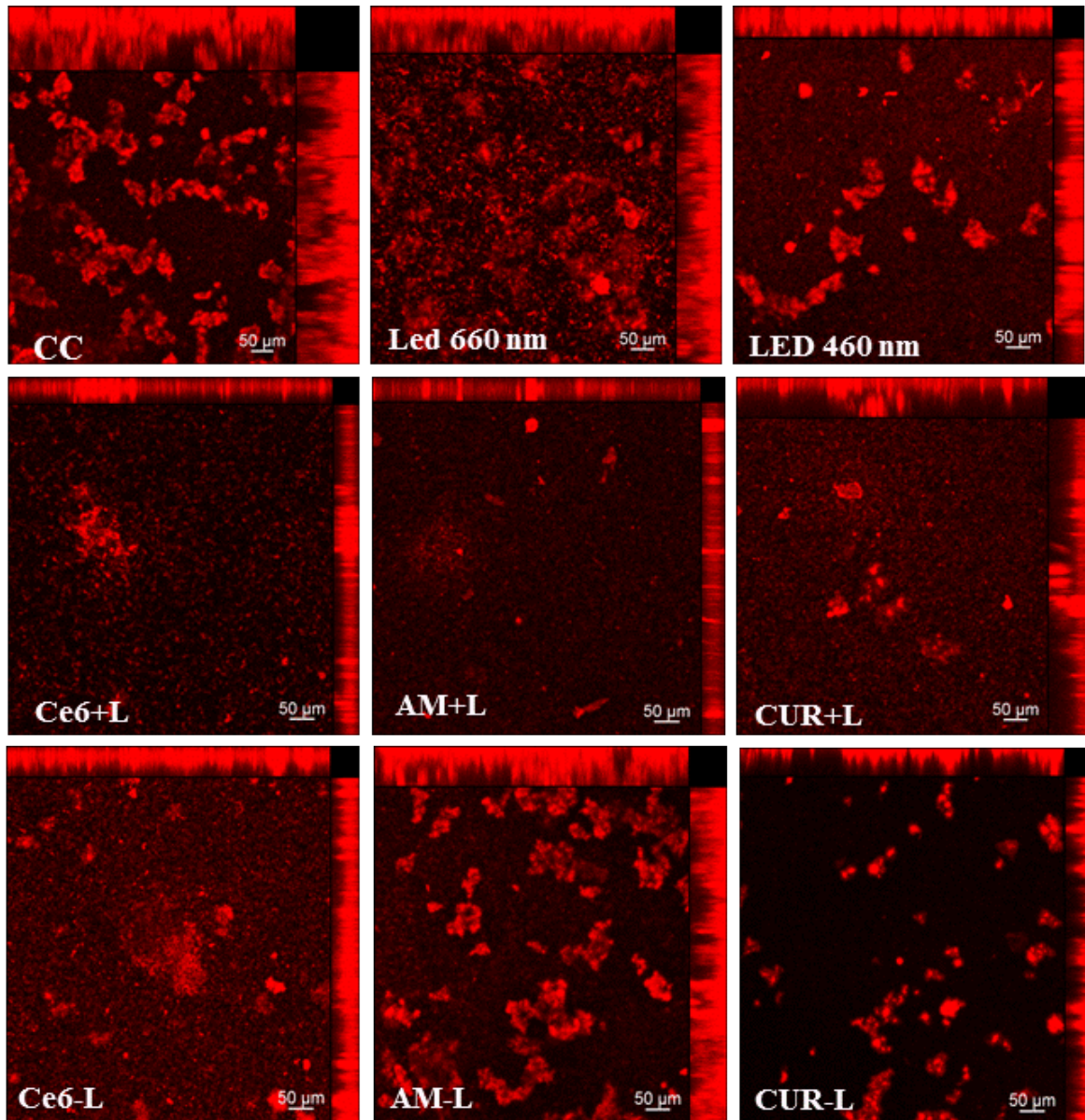


Figura 36. Avaliação do dano nos componentes proteicos da matriz extracelular do biofilme acneico após os tratamentos. Componentes visualizados em vermelho marcados com *Sypro Ruby Biofilm Matrix Stain*. (CC: Controle de crescimento; Ce6+L: clorina-e6 em combinação com a luz; AM+ L: azul de metileno em combinação com a luz; CUR+L: curcumina em combinação com a luz; Ce6-L; clorina-e6 na ausência de luz; AM-L: azul de metileno na ausência de luz; CUR- L: curcumina na ausência de luz.

Os dados de quantificação de emissão de fluorescência demonstraram que para o três fotossensibilizadores utilizados, houve redução da detecção de

fluorescência para os grupos TFD, indicando que a terapia acarretou danos aos componentes proteicos da matriz dos biofilmes (figura 37, 38 e 39).

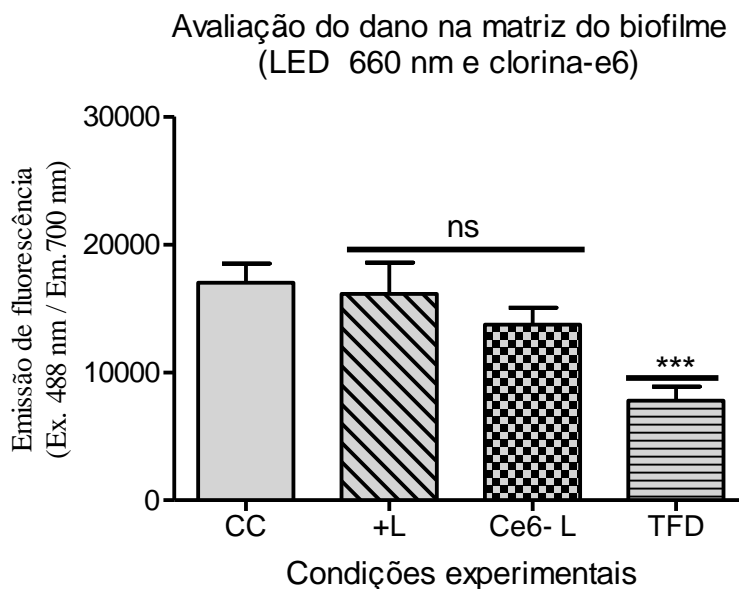


Figura 37. Emissão de fluorescência entre os grupos avaliados. As colunas representam os valores médios de redução e as barras representam o desvio-padrão (n=5). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). ***p<0,001; ns: não significativo. (CC: Controle de crescimento; +L: tratamento apenas com a luz vermelha; Ce6 - L: clorina-e6 na ausência de luz; TFD: terapia fotodinâmica).

Os resultados observados na figura 37 mostraram que houve diferença estatística entre os grupos TFD e CC. Entre os grupos CC e os grupos +L, Ce6-L não foi verificada diferença.

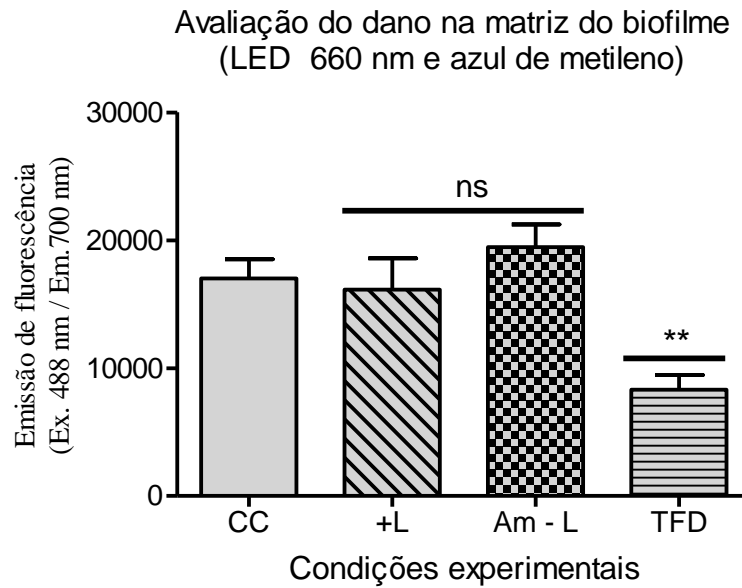


Figura 38. Emissão de fluorescência entre os grupos avaliados. As colunas representam os valores médios de redução e as barras representam o desvio-padrão (n=5). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). **p<0,01; ns: não significativo. (CC: Controle de crescimento; +L: tratamento apenas com a luz vermelha; Am - L: azul de metileno na ausência de luz; TFD: terapia fotodinâmica).

Os resultados observados na figura 38 mostraram que houve diferença estatística entre os grupos TFD e CC. Entre os grupos CC, +L e AM-L não foi observada diferença.

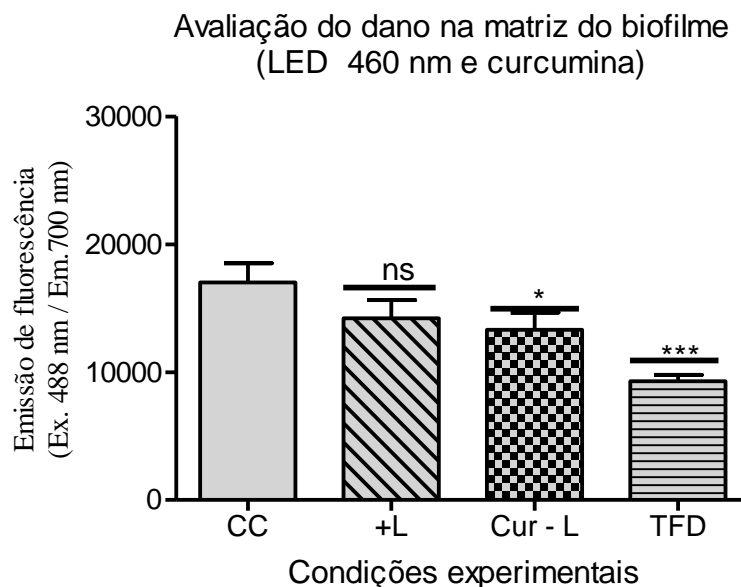


Figura 39. Emissão de fluorescência entre os grupos avaliados. As colunas representam os valores médios de redução e as barras representam o desvio-padrão (n=5). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; ns: não significativo. (CC: Controle de crescimento; +L: tratamento apenas com a luz azul; Cur - L: curcumina na ausência de luz; TFD: terapia fotodinâmica).

Os resultados observados na figura 39 mostraram que houve diferença estatística entre os grupos TFD e CC. Entre os grupos CC e +L não foi verificada diferença. Entre CC e CUR-L foi observada diferença, indicando que a curcumina na ausência de luz também pode ter acarretado dano nos componentes proteicos da matriz.

4.3. ESTUDO III

4.3.1. Viabilidade celular por MTT

A biocompatibilidade dos tratamentos propostos foi avaliada em um modelo de co-cultura 3D pelo método de MTT. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que os valores de viabilidade celular após o tratamento com TFD e CUR foi de 54,24%, apenas a luz azul 88,71% e apenas a CUR 81,54%. Após a análise estatística verificou-se que o grupo L+ não apresentou

diferença estatística em relação ao controle sem tratamento. Nos grupos TFD e CUR-L verificou-se diferença estatística em relação ao controle (figura 40).

De acordo com o ISO 10993-5:2009 para que um tratamento seja considerado tóxico, a viabilidade celular tem que ser menor que 70%. Quando observado 50% de inibição das células viáveis a toxicidade é considerada branda. Acima de 70% de inibição do crescimento, a toxicidade é considerada severa. Nesse contexto, podemos afirmar que o tratamento de TFD com CUR apresentou toxicidade branda e os tratamentos com a luz azul e CUR no escuro não foram tóxicos para as células.

A redução da viabilidade celular da curcumina na ausência de luz e irradiada também foi descrita por Fadeel *et al.*, (2020), utilizando uma linhagem celular de carcinoma epidermóide de células escamosas, incorporando esse FS em nanocarreadores lipídicos, demonstrando que esse sistema contendo a curcumina pode ser eficaz para combater o câncer de pele.

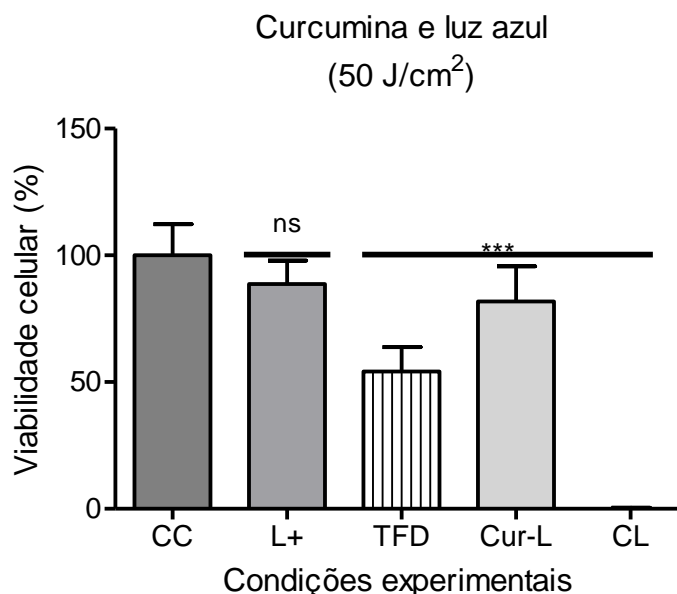


Figura 40. Avaliação da viabilidade celular após tratamento com LED 460 nm e curcumina (50 J/cm²). As colunas representam os valores médios de porcentagem entre os grupos avaliados e as barras representam o desvio-padrão (n=12). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). (CC: controle de crescimento; L+: aplicação da luz; TFD: terapia fotodinâmica; Cur - L: curcumina na ausência de luz; CL: controle de Lise) ***p<0,001; ns: não significativo.

Na figura 41 é possível verificar que a viabilidade celular após o tratamento com a luz vermelha foi 94,39%, AM no escuro 87,33% e TFD 3,56%. Após a análise estatística, verificou-se que o grupo L+ não apresentou diferença estatística em relação ao controle e os grupos TFD e Am-L apresentaram diferença em relação ao controle sem tratamento. A partir desses resultados, pode-se constatar que a luz vermelha e os AM no escuro não foram tóxicos para as células, mas, a TFD mediada por AM apresentou toxicidade severa para as células. É importante mencionar que, nos ensaios de TFD mediada por AM, foi observado que o tecido era desestruturado até o final da irradiação. Dessa forma, para que fosse possível a aquisição da imagem após o tratamento com TFD-AM, foi necessário reduzir o tempo de irradiação, a fim de visualizar o tecido ainda estruturado. Por essa razão, para o ensaio de MFC, as amostras tratadas com TFD-AM foram irradiadas a uma fluência de 40 J/cm² (129 mW/cm²). Dessa forma, foi realizado o ensaio de MTT para esse parâmetro também (figura 42) e foi verificado que a viabilidade celular após o tratamento com a luz vermelha foi de 96,51%, AM no escuro 89,80% e TFD 43,67%. Após a análise estatística, verificou-se que o grupo L+ não apresentou diferença estatística em relação ao controle e os grupos TFD e Am-L apresentaram diferença em relação ao controle sem tratamento. A partir do valor de viabilidade da TFD, a toxicidade foi considerada moderada. Além disso, foi possível observar que o efeito tóxico é dependente da fluência de luz empregada.

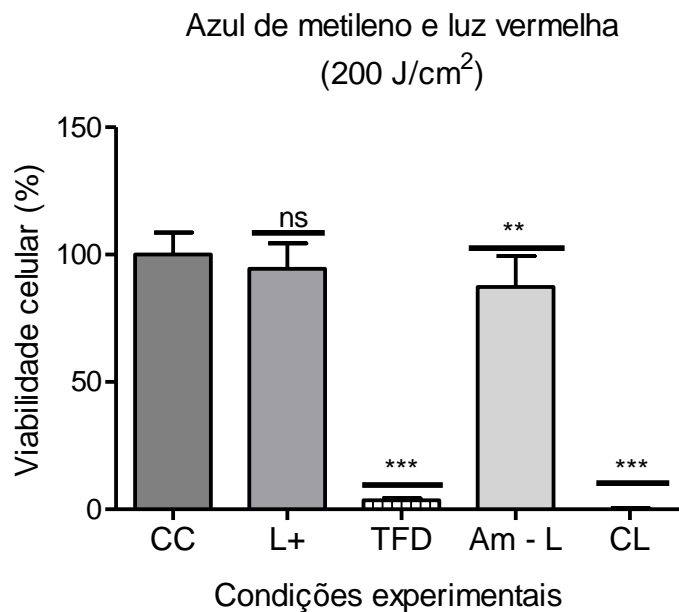


Figura 41. Avaliação da viabilidade celular após tratamento com LED 660 nm e azul de metileno (200 J/cm²). As colunas representam os valores médios de porcentagem entre os grupos avaliados e as barras representam o desvio-padrão (n=12). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). (CC: controle de crescimento; L+: aplicação da luz; TFD: terapia fotodinâmica; Am - L: azul de metileno na ausência de luz; CL: controle de Lise).**p<0,01; ***p<0,001; ns: não significativo.

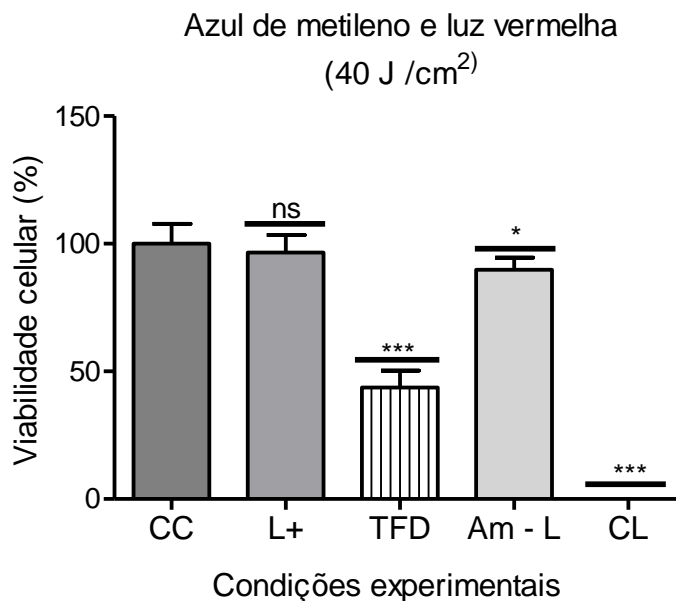


Figura 42. Avaliação da viabilidade celular após tratamento com LED 660 nm e azul de metileno (40 J/cm²). As colunas representam os valores médios de porcentagem entre os grupos avaliados e as barras representam o desvio-padrão (n=12). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). (CC: controle de crescimento; L+: aplicação da luz; TFD: terapia fotodinâmica; Am - L: azul de metileno na ausência de luz; CL: controle de Lise). *p<0,05; ***p<0,001; ns: não significativo.

De forma semelhante aos resultados observados com o AM, na figura 43 foi possível verificar que a luz e a Ce6 no escuro (82,54% de viabilidade) não apresentou efeito tóxico para as células. No entanto, a viabilidade após TFD mediada por Ce6 foi de 7,19%, indicando a toxicidade desse tratamento. A análise estatística demonstrou que não houve diferença nos grupos +L em relação ao controle. A diferença foi verificada nos grupos TFD e Ce6-L.

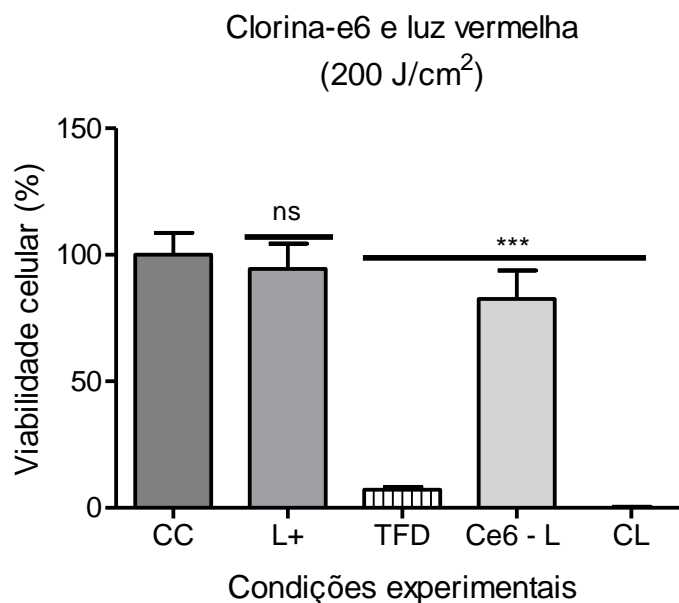


Figura 43. Avaliação da viabilidade celular após tratamento com LED 660 nm e clorina-e6 (200 J/cm²). As colunas representam os valores médios de porcentagem entre os grupos avaliados e as barras representam o desvio-padrão (n=12). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey). (CC: controle de crescimento; L+: aplicação da luz; TFD: terapia fotodinâmica; Ce6 - L: clorina-e6 na ausência de luz; CL: controle de Lise). ***p<0,001; ns: não significativo.

A citotoxicidade do azul de metileno em combinação com irradiação de LED vermelho foi avaliada também por Lamarque *et al.*, (2020). Os autores verificaram que a combinação de LED vermelho (7,5 J/cm²) e azul de metileno a uma concentração de 1 mg/mL reduziu significativamente a viabilidade celular de fibroblastos de camundongos (NIH/3T3) (33,3–63,2%) em diferentes tempos enquanto que o AM e LED sozinhos não apresentaram reduções significativas. Quanto à clorina-e6, NASR *et al.*, (2020) também investigaram a citotoxicidade da clorina-e6 em modelos de esferóides de fibroblastos e o efeito tóxico foi dependente da concentração e fluência de luz. Dessa forma, o efeito tóxico parece estar relacionado com o aumento da concentração do FS, fluência e intensidade de luz.

4.3.2. Caracterização e viabilidade celular do modelo de co-cultura 3D de pele por meio de Microscopia de fluorescência confocal

Na figura 44 é possível visualizar a estrutura do modelo 3D de pele desenvolvido. A imagem CC corresponde ao tecido sem nenhum tratamento. Nessa imagem, é visualizada a presença das células HaCaT e HDFn marcadas com ActinGreen™ 488 (em verde), Hoechst 33342 (núcleo – em azul), estruturadas em um modelo de cultivo em 3D. A imagem identificada como CL representa as células mortas tratadas com o tampão de lise (triton x 0,9%) marcadas com iodeto de propídio (em vermelho).

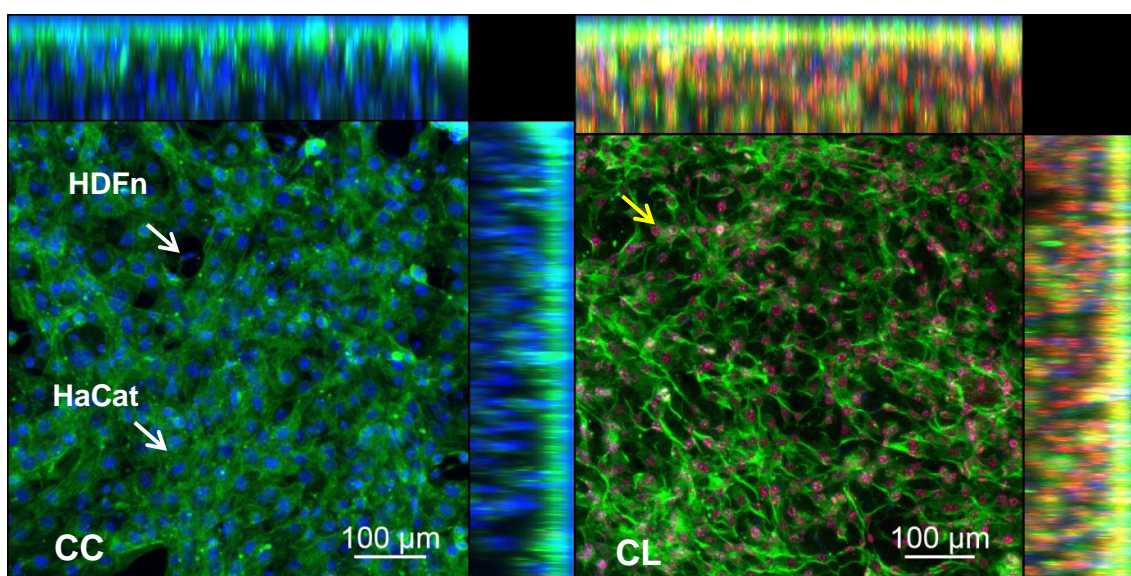


Figura 44. Análise e caracterização do modelo de pele 3D. Citoesqueleto em verde marcado com ActinGreen™ 488. Núcleo em azul (marcado com Hoechst 33342) e em vermelho, marcação IP, indicando morte celular. (CC: Controle de crescimento; HaCat: queratinócitos; HDFn: fibroblastos; CL: Controle de lise).

Foram realizadas também, as marcações no tecido a fim de avaliarmos qualitativamente as células após os tratamentos fotodinâmicos (Figura 45). Nas imagens a seguir, foi possível constatar que os dados corroboraram com os ensaios de viabilidade celular por MTT. No grupo CUR+L foi possível observar uma quantidade considerável de células mortas. Nos grupos Ce6 +L e AM+L pôde-se observar que as células mortas correspondem a maior extensão das imagens. Nos grupos CUR-L, Ce6-L, AM-L e LED 460 e 660 nm praticamente toda a extensão da imagem é composta por células vivas.

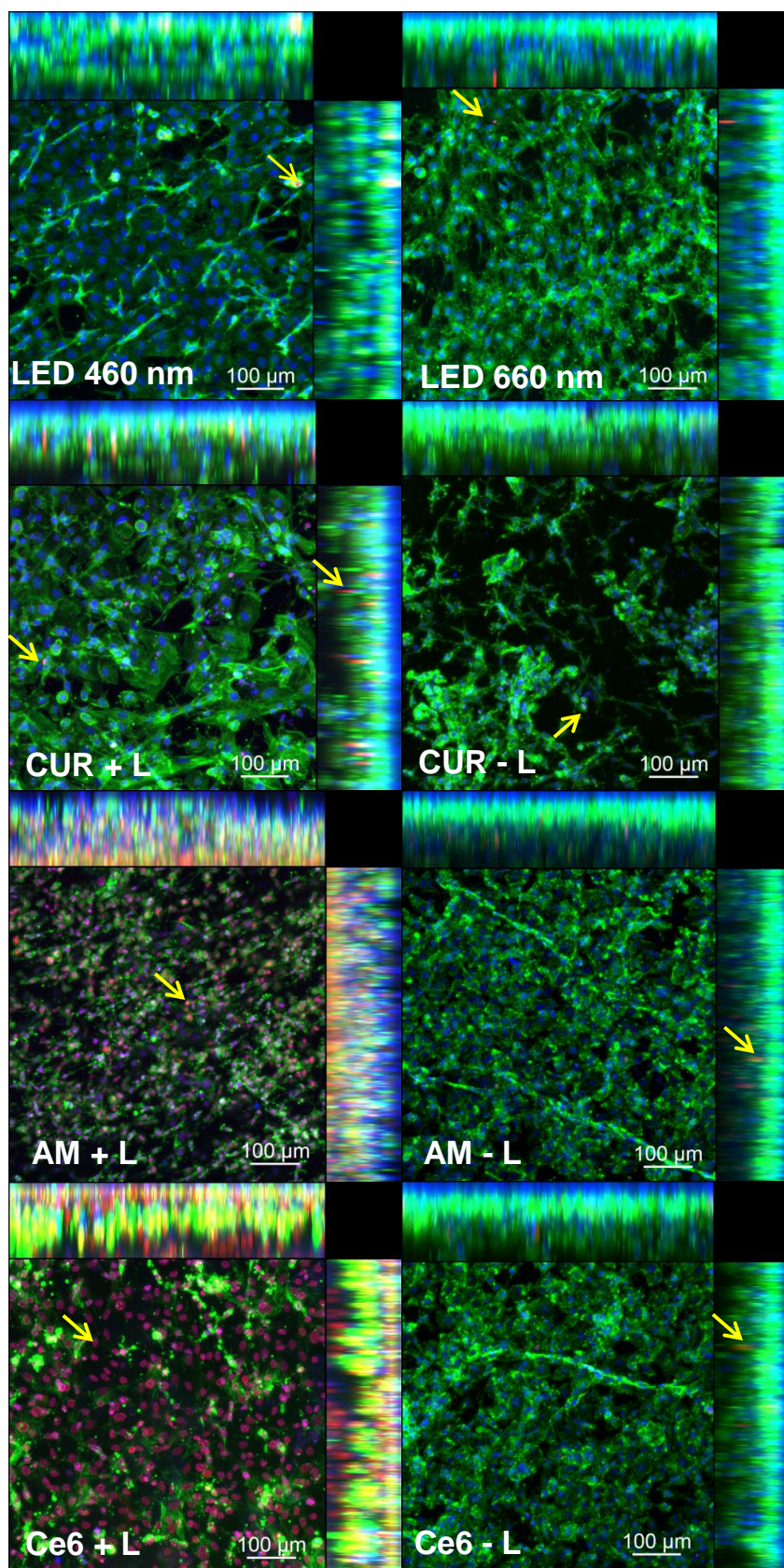


Figura 45. Representação do modelo 3D de pele após os tratamentos. Citoesqueleto marcado com ActinGreen™ 488. Núcleo em azul (marcado com Hoechst 33342) e em vermelho, marcação com PI, indicando morte celular. Setas em amarelo indicam células

mortas. (CUR + L: curcumina em combinação com a luz; CUR - L: curcumina no escuro; AM + L: azul de metileno na presença de luz; AM - L: azul de metileno no escuro; Ce6 + L: clorina-e6 em combinação com a luz; Ce6 - L: clorina - e6 no escuro).

Os ensaios de biocompatibilidade foram realizados com uma única aplicação dos tratamentos. Os parâmetros de FS e luz testados foram os mesmos estabelecidos nas aplicações consecutivas, realizadas nos ensaios microbiológicos (TFD CUR: Fluência de 50 J/cm² /150 mW/cm² - TFD AM e Ce6: Fluência de 200 J/cm² /129 mW/cm²). No entanto, é importante reforçar que, para o ensaio de MFC, as amostras tratadas com TFD-AM foram irradiadas a uma fluência de 40 J/cm² (129 mW/cm²). Mesmo com essa fluência mais baixa, foi possível observar que as células mortas foram maioria na imagem AM+L, corroborando com o ensaio de MTT.

Apesar de ter sido constatado um efeito tóxico severo no tratamento de TFD mediada por Ce6 e AM e uma toxicidade branda nos ensaios com a curcumina, os resultados do presente estudo demonstraram que esses FSs podem ser promissores no tratamento da acne vulgar. Estratégias de terapia combinada (DE FREITAS, *et al.*, 2018) ou ainda, o estudo de sistemas de liberação de fármacos controlados, que apresentem seletividade aos microrganismos (PATEL E PRABHU, 2020), pode ser uma alternativa segura e eficaz, quando o alvo não for o dano nas células adjacentes.

5. CONCLUSÕES

Com base nas metodologias empregadas pode-se concluir que a TFD mediada por curcumina, azul de metileno e clorina-e6 é uma alternativa viável para inativação parcial ou total das células em biofilmes acneicos formados por *C. acnes*, *S. epidermidis* e *S. aureus*.

A curcumina apresentou atividade antimicrobiana significativa quando combinada com a luz, tempo maior de internalização nos biofilmes e, embora tenha apresentado rápida fotodegradação, não degradou por completo até o final de irradiação. A clorina-e6 também apresentou redução significativa nas células do biofilme em combinação com a luz, tempo relativamente curto de internalização no biofilme e fotodegradação lenta. A TFD mediada por azul de metileno inativou completamente as células do biofilme com apenas três

aplicações fotodinâmicas, o azul de metileno internalizou rapidamente no biofilme e apresentou fotodegradação lenta. Dessa forma, verificou-se que o sucesso das aplicações consecutivas pode ser dependente do FS utilizado. Também foi possível observar que, a TFD mediada pelos três FSs foi capaz de causar danos nos componentes proteicos da matriz polimérica extracelular.

A TFD mediada por curcumina apresentou toxicidade branda enquanto que a terapia mediada por azul de metileno e clorina-e6 apresentaram toxicidade severa nos parâmetros utilizados nos biofilmes. Esse efeito parece ser dependente da fluência de luz empregada. No entanto, no caso do alvo não ser as células adjacentes do paciente, existem estratégias que podem minimizar esse efeito, como o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, capazes de entregar os FSs de forma seletiva.

Por fim, tomados em conjunto, os resultados obtidos nesse estudo revelaram que os três FSs estudados podem ser promissores para o desenvolvimento de protocolos clínicos eficientes no tratamento da acne vulgar.

6. ARTIGOS PUBLICADOS NO PERÍODO:

1-) LORDELLO, V. B. ; MENEGUIN, A. B. ; **DE ANNUNZIO, S. R.** ; TARANTO, M. P. ; CHORILLI, MARLUS ; FONTANA, CARLA RAQUEL ; CAVALLINI, D. C. U. Orodispersible Film Loaded with Enterococcus faecium CRL183 Presents Anti-Candida albicans Biofilm Activity In Vitro. **PHARMACEUTICS**, v. 13 n. 7, 998, 2021. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13070998>. **JCR: 6.32**

2-) COSTA, N. C. S. ; PICCOLI, J. P. ; SANTOS-FILHO, N. A. ; CLEMENTINO, L. C. ; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; **DE ANNUNZIO, S. R.** ; FONTANA, C.R. ; VERGA, J. B. M. ; ETO, S. F. ; PIZAURO-JUNIOR, J. M. ; GRAMINHA, M. A. S.; CILLI, EDUARDO M. Antimicrobial activity of RP-1 peptide conjugate with ferrocene group. **PLoS One**, v. 15, n. 3, e0228740-22, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228740>. **JCR: 2.74**

3-) DE PAULA ZAGO, L. H. ; **DE ANNUNZIO, S. R.**; DE OLIVEIRA, K. T. ; BARBUGLI, P. A. ; BARRETO, I. M. Q; FERES, M. ; FONTANA, C. R. Antimicrobial photodynamic therapy against metronidazole-resistant dental plaque bacteria. **JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B-BIOLOGY**, v. 209, 111903-40, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111903>. **JCR: 4.38**

4-) SAMPAIO, L. S.; **DE ANNUNZIO, S. R.** ; DE FREITAS, L. M. ; DANTAS, L. O. ; DE BONI, L. ; DONATONI, M. C. ; DE OLIVEIRA, K. T.; FONTANA, C. R. Influence of light intensity and irradiation mode on methylene blue, chlorin-e6 and curcumin-mediated photodynamic therapy against Enterococcus faecalis. **PHOTODIAGNOSIS AND PHOTODYNAMIC THERAPY**, v. 31, 101925, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101925>. **JCR: 2.89**

5-) DE SANTANA, W. M. O.S. ; CAETANO, B. L. ; **DE ANNUNZIO, S. R.** ; PULCINELLI, S. H. ; MÉNAGER, C. ; FONTANA, C. R. ; SANTILLI, C. V. . Conjugation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles and curcumin photosensitizer to assist in photodynamic therapy. **COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTERFACES**, v. 196, 111297, Dez., 2020. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111297>. **JCR: 4.38**

6-) SILVESTRE, A. L. P. ; DELELLO DI FILIPPO, L. ; BESEGATO, F. J. ; **DE ANNUNZIO, S. R.** ; ALMEIDA F. C. B. ; BORGES, G. M.P. ; RASTELLI, A. N. S. FONTANA, C. R. ; CHORILLI, M. Current applications of drug delivery nanosystems associated with antimicrobial photodynamic therapy for oral infections. **INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS**, v. 592, 120078, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120078>. **JCR: 4.84**

7-) CALIXTO, G. ; **DE ANNUNZIO, S. R.**; VICTORELLI, F. ; FRADE, M. L. ; FERREIRA, P. S. ; CHORILLI, M. ; FONTANA, C. R. Chitosan-Based Drug Delivery Systems for Optimization of Photodynamic Therapy: a Review. **AAPS**

PHARMSCITECH, v.20, 253, 2019. <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1407-y>.
JCR: 2.40.

8-) OLIVEIRA, A. B. ; FERRISSE, T. M. ; MARQUES, R. S.; **DE ANNUNZIO, S. R.** ; BRIGHENTI, F. L. ; FONTANA, CARLA . Effect of Photodynamic Therapy on Microorganisms Responsible for Dental Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis. **INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES**, v. 20, n. 14, 3585, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20143585>. **JCR: 4.18**

9-) **DE ANNUNZIO, S. R.**; COSTA, N. C.S.; MEZZINA, R. D. ; GRAMINHA, M. A. S. ; FONTANA, C. R . Chlorin, Phthalocyanine, and Porphyrin Types Derivatives in Phototreatment of Cutaneous Manifestations: A Review. **INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES**, v. 20, n. 16, 3861, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20163861>. **JCR: 4.18**

10-) MARTINS, D. S. ; AUGUSTO M. C. P. ; LEITE S. I.; INADA N. M. ; **DE ANNUNZIO, S. R.** ; FONTANA, C.; CAMPANA-FILHO, S. P.; CORRÊA, D. S. Core-sheath nanostructured chitosan-based nonwovens as a potential drug delivery system for periodontitis treatment. **INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES**, v. 142, p. 521-534, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.124>. **JCR: 5.16**

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K.A.; FOSTER, T.H.; GIROTTI, A.W.; GOLLNICK, S.O.; HAHN, S.M.; HAMBLIN, M.R.; JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; et al. Photodynamic therapy of cancer: An update. **CA Cancer J. Clin.**,v.61, p. 250–281, 2011.

AKAZA, N.; AKAMATSU, H.; NUMATA,S. et al. . Microorganisms inhabiting follicular contents of facial acne are not only Propionibacterium but also Malassezia spp. **Journal of Dermatology**, v.43, p.906-911, 2016.

AKHAVAN, A.; BERSHAD, S. Topical acne drugs: review of clinical properties, systemic exposure, and safety. **Am. J. Clin. Dermatol.**, v. 4, n. 7, p. 473-492, 2003.

ALVES, E. et al. An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 141–164, 2014.

ANDRADE, M.C.; RIBEIRO, A.P.; DOVIGO, L.N.; BRUNETTI, I.L.; GIAMPAOLO, E.T.; BAGNATO, V.S.; PAVARINA, A.C. Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of Candida spp. **Arch Oral Biol.**,v.58, p. 200-210, 2013.

ASHKENAZI, H.; MALIK, Z.; HARTH, Y.; NITZAN Y. Eradication of *Propionibacterium acnes* by its endogenous porphyrins after illumination with high intensity blue light. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v.35, p. 17-24, 2003

BACELLAR, I.O.L. et al., Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death, **Int. J. Mol. Sci.** v.16, p.20523–20559, 2015.

BARBUGLI, P. A. **Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica na progressão tumoral e em modelos celulares tridimensionais.** Tese de Doutorado - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, USP, Ribeirão Preto, 2010.

BEIRÃO, S. et al., Photodynamic inactivation of bacterial and yeast biofilms with a cationic porphyrin. **Photochem Photobiol.** v. 90, p. 387-96, 2014.

BEYLOT, C.; AUFFRET, N.; POLI, F. et al. *Propionibacterium acnes*: an update on its role in the pathogenesis of acne. **J Eur Acad Dermatol Venereol.**, v. 28, n.3, p. 271-278, 2013.

BOEN, M.; BROWNELL, J. PATEL, P.; TSOUKAS, M.M. The Role of Photodynamic Therapy in Acne: An Evidence-Based Review. **Am J Clin Dermatol.** v.18, p. 311-321, 2017.

BRAKSTAD, O.G.; AASBAKK, K.; MAELAND, J.A. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. **J Clin Microbiol.** v. 30, p. 1654-1660, 1992.

BRUZELL, E.M.; MORISBACK, E., TONNESEN, H.H. Studies on curcuma and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations, **Photochem. Photobiol. Sci.**, 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.

CALIXTO, G. ; DE ANNUNZIO, S. R.; VICTORELLI, F. ; FRADE, M. L. ; FERREIRA, P. S. ; CHORILLI, M. ; FONTANA, C. R. Chitosan-Based Drug Delivery Systems for Optimization of Photodynamic Therapy: a Review. **AAPS PHARMSCITECH**, v.20, 253, 2019.

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

CAUICH-SANCHEZ P.; ALATRISTE-MONDRAGON F.; GARCIA-CANO E.; AQUINO-SANTIAGO, C. Identification of anaerobic nonsporeforming gram-

positive bacilli by biochemical tests and gas-liquid chromatography. **Rev Latinoam Microbiol**, v. 14, p. 27-35, 2001.

CHOKR, A.; WATIER, D.; ELEAUME, H. et al. Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase negative staphylococci. **In J Med Microbiol.**, v.296, p.381-388, 2006.

CIEPLIK, F.; TABENSKI, L.; BUCHALLA, W.; MAISCH, T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens, **Front. Microbiol.**, v.5, p.1-4, 2014.

CORRÊA, J. C. **Fotodegradação do photodithazine e citotoxicidade dos fotoprodutos formados após irradiação com o laser.** Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

COTTERILL, J. A.; CUNLIFFE, W. J. Suicide in dermatological patients. **Br. J. Dermatol.**, v.137, n.2, p.246-250, 1997. 8. GUPTA, M.A.; GUPTA, A.K. Depression and suicidal ideation in dermatology patients with acne, alopecia areata, atopic dermatitis and psoriasis. **Br. J. Dermatol.**, v. 139, n.5, p. 846-850, 1998.

DANTAS, L. O. **Quantificação da fotodegradação de compostos orgânicos fotossensíveis.** 2017. 24 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Físicas e Biomoleculares) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

DE ANNUNZIO S. R.; COSTA, N. C. SILVA ; MEZZINA, R. D ; GRAMINHA, M. A. S. ; FONTANA, C. R . Chlorin, Phthalocyanine, and Porphyrin Types Derivatives in Phototreatment of Cutaneous Manifestations: A Review. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 16, 3861, 2019.

DE ANNUNZIO, S.R.; FREITAS, L. M., BLANCO. A.L. et al. . Susceptibility of *Enterococcus faecalis* and *Propionibacterium acnes* to antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v.178, p.545-550, 2018.

DE FREITAS, L.M.; LORENZÓN, E.N.; SANTOS-FILHO, N.A.; ZAGO, L.H.; DE P.; ULIANA, M. P.; DE OLIVEIRA, K. T.; FONTANA, C. R. Antimicrobial Photodynamic therapy enhanced by the peptide aurein 1.2. **Scientific Reports**, v. 8, 4242, 2018.

DE ANNUNZIO, S.R. **Atividade antimicrobiana sinérgica da terapia fotodinâmica e tetraciclina contra *Propionibacterium acnes*.** 87 f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, Unesp, 2017.

DEGITZ, K.; PLAXZEK, M.; BORELLI, C.; PLEWIG, G. Pathophysiology of acne. **J. Dtsch Dermatol Ges.**, v.5, n. 4, p.316-323, 2007.

DESSINIOTI, C.; KATSAMBAS, A. Propionibacterium acnes and antimicrobial resistance in acne. **Clinics in Dermatology**, v.35, p.163-167, 2017.

DIOGO, P. et al. Antimicrobial photodynamic therapy against endodontic Enterococcus faecalis and Candida albicans mono and mixed biofilms in the presence of photosensitizers: a comparative study with classical endodontic Irrigants, **Front. Microbiol.** v.8, p. 1-11, 2017

DOVIGO, L.N.; PAVARINA, A.C.; CARMELLO, J.C. et al. Susceptibility of clinical isolates of Candida to photodynamic effects of curcumin. **Lasers Surg Med.**, v.43, n. 9, p. 927-934, 2011(a).

DOVIGO, L.N. et al. ., Investigation of photodynamic effects of curcumin against Candida albicans, **Photochem. Photobiol.**, v.87, p.895-903, 2011(b).

EISHI, Y.; SUGA, M.; ISHIGE, I.; KOBAYASHI, D.; YAMADA, T.; TAKEMURA, T.; TAKIZAWA, T.; KOIKE, M.; KUDOH, S.; COSTABELU GUZMAN, J.; RIZZATO, G.; GAMBACORTA, M.; et al. Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese and European patients with sarcoidosis. **J Clin Microbiol**, .v. 40, p. 198-204, 2002.

FADEEL, D. A. A.; KAMEL, R.; FADEL, M. PEGylated lipid nanocarrier for enhancing photodynamic therapy of skin carcinoma using curcumin: in-vitro/in-vivo studies and histopathological examination. **Scientific Reports**, n.10:10435, 2020.

FARD, S.S.; AMIN, M.; KHODAPARAST, L.; KHODAPARAST, L.; CHOGHAKABODI, P.M., et al. Detection of Biofilm Phenotype of Isolated *Staphylococcus epidermidis* from Respiratory Catheters of Hospitalized Patients and Evaluation the Effect of Antibodies against SesC Protein on Biofilm Formation. **Clin Microbiol**, v.4, p. 221, 2015.

FELDMAN, S.; CARECCIA, R.E.; BARHAM, K.L.; HANCOX, J. Diagnosis and treatment of acne. **Am. Fam. Physician**, v.69, n.9, p.2123-2130, 2004.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat. Rev. Microbiol.** v.8, p. 623–633, 2010.

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., CSONGRADI, C., AUCAMP, M., DU PLESSIS, J., & GERBER, M. Treatment Modalities for Acne. **Molecules**, v. 21, n.8, .p.1-20, 2016.

FRADE, M. L.; ANNUNZIO, S.R.; CALIXTO, G.M.F. et al. Assessment of Chitosan-Based Hydrogel and Photodynamic Inactivation against *Propionibacterium acnes*. **Molecules**, v. 23, p.1-16, 2018.

FULAZ, S.; VITALE, S.; QUINN, L.; CASEY, E. Nanoparticle–Biofilm Interactions: The Role of the EPS Matrix. **Trends in Microbiology**, v.27, p. 915-926, 2019.

GOLLNICK, H. Current concepts of the pathogenesis of acne, Implications for **Drug Treatment.**, v. 63, p.1579–1596, 2003 (a).

GOLLNICK, H.; CUNLIFFE, W.; BERSON, D.; et al. Management of acne: A report from a global alliance to improve outcomes in acne. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.49, p.1–37, 2003 (b).

GORDON, O. **Oxidative transformation of curcumin: products and reaction mechanisms.** Thesis. (Doctoral of Philosophy in Pharmacology). Nashville (NSH): Vanderbilt University. 2014.

GOULART, R.C. et al. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Photomed Laser Surg.**, v.28, p.53-60, 2010.

GRIMM, B.; PORRA, R.J.; DIGER, W.R.; SCHEERS, H. Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications, H. Springer, **The Netherlands**, p. 1–26, 2006.

GUPTA, M.A.; GUPTA, A.K. Depression and suicidal ideation in dermatology patients with acne, alopecia areata, atopic dermatitis and psoriasis. **Br. J. Dermatol.**, v. 139, n.5, p. 846-850, 1998.

HABESHIAN, K.A.; COHEN, B.A. Current Issues in the Treatment of Acne Vulgaris. **Pediatrics**, v. 145, p. S225-S230, 2020.

HENDERSON, B.W.; DOUGHERTY, T.J.; How does photodynamic therapy work? **Photochem Photobiol.**, v.5, p. 145-157, 1992

HONGCHARU, W.; TAYLOR, C.R.; CHANG, Y. et al. Topical, ALA-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris. **J Invest Dermatol.**, v.115, p.183-192, 2000.

HONRAET K.; ROSSEL B.; COENYE T. The acne biofilm. In: ZOUBOULIS, Christos C. et al. (Ed.). **Pathogenesis and treatment of acne and rosacea.** Berlin Heidelberg: Springer, 2014. ISBN: 978-3-540-69375-8.

HUANG L., DAI T.; HAMBLIN M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation and photodynamic therapy for infections. **Methods Mol. Biol.**, v.635, p. 155–173, 2010.

HUANG, L. et al. Photodynamic inactivation of bacteria using Polyethylenimine–Chlorin(e6) conjugates: effect of polymer molecular weight, substitution ratio of Chlorin(e6) and pH, **Lasers Surg. Med.**, v.43, p.313–323, 2011.

International Standard ISO 10993-5. Third edition 2009-06-01.

ISSA, M.C.A.; BOECHAT, M.; E FASSINI, A.C. Photodynamic therapy in Brazil: 10 years of history. **Surg Cosmet Dermatol**, v. 8, n. 4 Supl. 1, p. S16-22, 2016.

JAHNS, A.C.; ALEXEYEV, O. A. Three dimensional distribution of Propionibacterium acnes biofilms in human skin. **Experimental Dermatology**, v.23, p.682–689, 2014.

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.

JUNQUEIRA, H.C.; SEVERINO, D.; DIAS, L.G.; GUGLIOTTI, M.; BAPTISTAMS. Modulation of the methylene blue photochemical properties based on the adsorption at aqueous micelle interfaces. **Phys Chem Chem Phys**, v.4, p. 2320—2328, 2002.

JUSUF, N.K.; PUTRA, I. B.; SARI, L. Differences of Microbiomes Found in Non-Inflammatory and Inflammatory Lesions of Acne Vulgaris. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 13, p. 773-780, 2020.

JUZENIENE, A.; JUZENAS, P.; MA, L.W. et al. J. Topical application of 5-aminolaevulinic acid, methyl 5-aminolaevulinate and hexyl 5-aminolaevulinate on normal human skin. **Br J Dermatol.**, v.155, n. 4, p.791-799, 2006.

KATSAMBAS, A.; PAPAKONSTANTINOOU, A. Acne: systemic treatment. **Clin Dermatol.**, v. 22, n. 5, p.412-418, 2004. 27.

KEYAL, U.; BHATTA, A.K.; WANG, X.L. Photodynamic therapy for the treatment of different severity of acne: A systematic review. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 14, p.191-199, 2016.

KHARKWAL, G. B.; SHARMA, S. K.; HUANG, Y.Y.; DAI, T.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. **Lasers Surg Med.**, v.43, p.755-767, 2011.

KLEIN, I. M.; GONCALVES, G.R. Detection of Tannerella forsythensis (Bacteroides forsythus) and Porphyromonas gingivalis by Polymerase Chain Reaction in Subjects with Different Periodontal Status. **Journal of Periodontology (1970)**, v. 74, n.6, p. 798-802, 2003.

KRISTIAN, S.A; BIRKENSTOCK, T.A.; SAUDER, U. et al. Biofilm formation induces C3a release and protects Staphylococcus epidermidis from IgG and

complement deposition and from neutrophil-dependent killing. **J Infect Dis.**, v. 197, p. 1028-1035, 2008.

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

LAMARQUE, G. C. C.; CUSICANQUI MÉNDEZ D.A., ARRUDA A. M.; DIONÍSIO, J. et al. Cytotoxic effect and apoptosis pathways activated by methylene blue-mediated photodynamic therapy in fibroblasts. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 29, 101654, 2020.

LEYDEN, J.J.; MCGINLEY, K.J.; VOWELS, B. *Propionibacterium acnes* colonization in acne and nonacne. **Dermatology**, v. 196, p. 55–58. 1998.

LI, M.K.; LIU, C.; HSU, J.T.S. The Use of Lasers and Light Devices in Acne Management: An Update. **Am J Clin Dermatol**, v. 22, n. 6, p. 785-800, 2021.

LI, S.S.; ZHANG, L.L.; NIE, S.; L.V.; T.; WANG, H.W. Severe acne in monozygotic twins treated with photodynamic therapy. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v. 23, p. 235–236, 2018.

LUKE-MARSHALL, N.R.; HANSEN, L.A.; SHAFIRSTEIN, G.; CAMPAGNARI, A.A. Antimicrobial Photodynamic Therapy with Chlorin e6 Is Bactericidal against Biofilms of the Primary Human Otopathogens. **mSphere.**, v.15, 5, n. 4, e00492-20, 2020.

MACHADO, A.E.D. Photodynamic therapy: Principles, potential of application and perspectivas. **Quimica nova**, v.23, n.2, p.237-243, 2000.

MANG, T.; ROGERS, S.; KEINAN, D.; HONMA, K.; BAIER, R. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) induction of biofilm matrix architectural and bioadhesive modifications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.13, p. 22–28, 2016.

MANG; T. S. Dosimetric concepts for PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 5, p. 217–223, 2008.

MCINTURFF, J.E.; KIM, J. The role of toll-like receptors in the pathophysiology of acne. **Semin Cutan Med Surg.** v.24, n.2, p. 73-78, 2005.

MONTANARO, L.; CAMPOCCIA, D.; ARCIOLA, C.R. Advancements in molecular epidemiology of implant infections and future perspectives. **Biomaterials**, v. 28, p. 5155-5168, 2007.

MOON, S.H.; ROH, H.S.; KIM, Y.H.; KIM, J.E.; KO, J.Y.; RO, Y.S. Antibiotic resistance of microbial strains isolated from Korean acne patients. **J Dermatol**, v. 39, p. 833–837, 2012.

MOREIRA, L.M.; LYON, J.P.; ROMANI, AP. et al. Phenothiazinium dyes as photosensitizers (ps) in photodynamic therapy (pdt): spectroscopic properties and photochemical mechanisms. **Advanced Aspects of Spectroscopy**, p. 393–420, 2012.

MOY, L. S.; FROST, D.; MOY, S. Photodynamic Therapy for Photodamage, Actinic Keratosis, and Acne in the Cosmetic Practice. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v.28, n.1, p.135–148, 2020.

NAGATA, J.Y.; HIOKA, N.; KIMURA, E.; BATISTELA, V.R.; TERADA, R.S.; GRACIANO, A.X.; BAESSO, M.L.; HAYACIBARA, M.F. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: Evaluation of the photosensitizers used and light source properties. **Photodiagn. Photodyn. Ther.** v. 9, p. 122–131, 2012.

NAKATSUJI, T.; CHIANG, H.I.; JIANG, S.B.; NAGARAJAN, H.; ZENGLER, K.; GALLO, R. The microbiome extends to subepidermal compartments of normal skin. **Nat Commun.** v. 4, p. 1–8, 2013.

NASR, S.; RADY, M.; SEBAK, A.; GOMAA, I.; et al. A Naturally Derived Carrier for Photodynamic Treatment of Squamous Cell Carcinoma: In Vitro and In Vivo Models. **Pharmaceutics**, v. 29, n.6, p. 1-15, 2020.

Neill, A.M.; Gallo, R.L. Host-microbiome interactions and recent progress into understanding the biology of acne vulgaris. **Microbiome.** v.6, p. 1–16, 2018.

NEVES. J.R.; FRANCESCONI, A.C.; RIBEIRO, B. M.; FOLLASOR, I.; ALMEIDA, L.M.C. Propionibacterium acnes e a resistência bacteriana. **Surg Cosmet Dermatol**, v. 7, n. 3 Supl 1, p. S27-38, 2015.

OLIVEIRA, K.T.D. et al., Chlorins: natural sources, synthetic developments and main applications, **Curr. Org. Synth.** v. 11, n.1 p.42–58, 2014.

PARISER, D.M.; EICHENFIELD, L.F.; BUKHALO, M.; WATERMAN, G.; JARRATT, M. PDT Study Group. Photodynamic therapy with methyl aminolaevulinate 80 mg g⁻¹ for severe facial acne vulgaris: A randomized vehicle-controlled study. **Br. J. Dermatol**, v. 174, p. 770–777, 2016.

PASCHOAL, F.M.; ISMAEL, A. P. P. B. A ação da luz no tratamento da acne vulgar. **Surg Cosmet Dermatol.**, v.2, p. 117-23, 2010.

PATEL, R.; PRABHU, P. Nanocarriers as versatile delivery systems for effective management of acne. **Int J Pharm.**, v.15, 2020.

PEREIRA, C.A.; ROMEIRO, R.L.; COSTA, A.C.; MACHADO, A.K.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. **Lasers Med Sci.**, v.26, p.341–348, 2011.

PERKINS, A.C.; MAGLIONE, J.; HILLEBRAND, G.G.; MIYAMOTO, K.; KIMBALL, A.B. Acne vulgaris in women: prevalence across the life span. **J Womens Health**, v.21, n.2, p. 223-230, 2012.

PIMENTEL, B.N.A.D.S.; MARIN-DETT, F.H.; ASSIS, M.; BARBUGLI, P.A.; LONGO, E.; VERGANI, C.E. Antifungal Activity and Biocompatibility of α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ Using a Three-Dimensional Coculture Model of the Oral Mucosa. **Front Bioeng Biotechnol**, v.10, 826123, 2022.

PINTO, R. M.; SOARES, F. A.; REIS, S.; NUNES, C.; VAN DIJCK, P. Innovative Strategies Toward the Disassembly of the EPS Matrix in Bacterial Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v.11, p.1-20, 2020

POLLOCK, B.; TURNER, D.; STRINGER, M.R. et al. Topical aminolaevulinic acid acid photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris: A study of clinical efficacy and mechanism of action. **Br J Dermatol.**, v.151, p.616-622, 2004.

QUISHIDA, C.C.; MIMA, E.G.; DOVIGO, L.N. Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using Photodithazine(®) and LED light after one and three successive applications. **Lasers Med Sci.**, v.30, p.1-10, 2015.

RIBEIRO, M. S. et al. Laser em Baixa Intensidade. In: Técnicas e Procedimentos Terapêuticos. [s.l: s.n.]. p. 945–953.

RYU, A.R.; LEE, M.Y. Chlorin e6-mediated photodynamic therapy promotes collagen production and suppresses MMPs expression via modulating AP-1 signaling in P. acnes-stimulated HaCat cells. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 20, p. 71–77, 2017.

SAMPAIO, L. SIMÕES ; DE ANNUNZIO, S. R. ; DE FREITAS, L. M. ; DANTAS, L. O. ; DE BONI, L. ; DONATONI, M. C. ; DE OLIVEIRA, K. T. ; FONTANA, C. R. Influence of light intensity and irradiation mode on Methylene blue, Chlorin-e6 and Curcumin-Mediated Photodynamic Therapy against Enterococcus faecalis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, 101925, 2020.

SACHDEVA, M.; TAN, J. LIM, J.; KIM, M.; NADEEM, I.; BISMIL, R. The prevalence, risk factors, and psychosocial impacts of acne vulgaris in medical students: a literature review. **Int J Dermatol.**, v. 60, n. 7, p. 792-798, 2021.

SCHERER, K.M.; BISBY, R.H.; BOTCHWAY, S.W.; PARKER, A.W. New Approaches to Photodynamic Therapy from Types I, II and III to Type IV Using One or More Photons. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 17, p. 171–189, 2017.

SITOHANG, I.B.S.; FATHAN, H.; EFFENDI, E.; WAHID, M. The susceptibility of pathogens associated with acne vulgaris to antibiotics. **Med J Indones**, v.28, p. 21–27, 2019.

SIEGEL, D.M.; WILLEY, A.; GOLDMAN, MP. Photodynamic Therapy with 5-aminolevulinic Acid 10% Gel and Red Light for the Treatment of Actinic Keratosis, Nonmelanoma Skin Cancers, and Acne: Current Evidence and Best Practices. **J Clin Aesthet Dermatol**, v.14, p. E53-E65, 2021.

SONG, M.; SEO, S.; KO, H. et al. Antibiotic susceptibility of Propionibacterium acnes isolated from acne vulgaris in Korea. **Journal of Dermatology**, v. 38, p.667–673, 2011.

SYAHRIAL, M.A.; NASUTION, D.; JUSUF, N.K.; LUBIS, S.E. A Resistensi Propionibacterium acnes Terhadap Antibiotika Oral Pada Pasien Akne Vulgaris di RSUP H. Adam Malik Medan. Medan: Universitas Sumatera Utara; 2009.

TAN, H.L.; PENG, Z.X.; LI, Q.T. et al. The use of quaternised chitosan-loaded PMMA to inhibit biofilm formation and downregulate the virulence-associated gene expression of antibiotic-resistant Staphylococcus. **Biomaterials**, v. 33, n. 2, p. 365-377, 2012.

TAN, J.K.L.; BHATE, K. A global perspective on the epidemiology of acne. **Br J Dermatol.**, v. 172, p. 3-12, 2015.

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

TARSTEDT, M.M.; GILLSTEDT, M.; WENNBERG LARKÖ, AM.; PAOLI, J. Aminolevulinic acid and methyl aminolevulinate equally effective in topical photodynamic therapy for non-melanoma skin cancers. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.3, p. 420-423. 2016

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012, 934 p.10

TUCHAYI, S. M.; MAKRANTONAKI, E.; GANCEVICIENE, R.; DESSINIOTI, C.; FELDMAN, S. R.; ZOUBOULIS, C. C. Acne vulgaris. **Nature Reviews Disease Primers**, v.1, p.1-20, 2015.

WAN, M.T.; LIN, J.Y. Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology, **Clin Cosmet Investig Dermatol.**, v.7, p.145-163, 2014.

WANG, Y.Y.; RYU, A.R; JIN, S. et al. Chlorin e6-Mediated Photodynamic Therapy Suppresses P. acnes-Induced Inflammatory Response via NFκB and MAPKs Signaling Pathway. **PLoS ONE**, v. 12, p. 1-21, 2017.

WEBSTER, G.F.; GRABER, E.M. Antibiotic treatment for Acne vulgaris. **Semin Cutan Med Surg.**, v. 27, p.183-187, 2008.

WEN, X.; LI, Y.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy in dermatology beyond non-melanoma cancer: An update. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v.19, p.140-152, 2017.

WIEGELL, S.R.; WULF, H.C. Photodynamic therapy of acne vulgaris using 5-aminolevulinic acid versus methylaminolevulinate. **J Am Acad Dermatol.**, v. 54, n. 4, p.647-651, 2006.

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

WILLIAMS, N.M.; RANDOLPH, M.; RAJABI-ESTARABADI, A. KERI, J. TOSTI A. Hormonal Contraceptives and Dermatology. **Am J Clin Dermatol**, v. 22, p. 69-80, 2021.

WU, C.; LABRIE, J.; TREMBLAY, Y.D.N.; HAINE, D.; MOUREZ, M.; JACQUEC, M. Zinc as an agent for the prevention of biofilm formation by pathogenic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v.115, p. 30-40, 2013

YANG, M.Y.; CHANG, K.C.; CHEN, L.Y.; HU, A. Low-dose blue light irradiation enhances the antimicrobial activities of curcumin against *Propionibacterium acnes*. **J Photochem Photobiol B.**, v.189, p. 21-28, 2018.

YANG, Q.Q. et al. Antimicrobial and anticancer applications and related mechanisms of curcumin-mediated photodynamic treatments, **Trends Food Sci. Technol.** v. 97, p. 341–354, 2020.

YEW, Y.W.; LAI, Y.C.; LIM, Y.L.; CHONG, W.S.; THENG, C.J. Photodynamic Therapy with Topical 5% 5-Aminolevulinic Acid for the Treatment of Truncal Acne in Asian Patients. **Drugs Dermatol**, v.5, p.727–732, 2016.

ZAGO, L. H. D. P. **Avaliação da redução e resistência bacteriana via múltiplos ciclos de terapia.** Tese de Doutorado - Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologias aplicadas à Farmácia, Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", Araraquara, 2019.

ZAGO, L. H. D. P. ; DE ANNUNZIO, S. R. ; DE OLIVEIRA, K. T. ; BARBUGLI, P. A. ; VALDES, B.R. ; FERES, M.; FONTANA, C. R. Antimicrobial photodynamic therapy against metronidazole-resistant dental plaque bacteria. **Journal of photochemistry and photobiology b-biology**, v. 209, p. 111903-40, 2020.

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


ZEITOUNI, N.C.; BHATIA, N.; CEILLEY, R.I.; COHEN, J.L.; DEL ROSSO, J.Q.; MOORE, A.Y.; MUNAVALLI, G.; PARISER, D.M.; SCHLESINGER, T.;

8. ANEXOS

APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA

Título da Pesquisa: Avaliação da terapia fotodinâmica contra biofilmes acneicos polimicrobianos: um estudo pré-clínico
Pesquisador Responsável: SARAH RAQUEL DE ANNUNZIO
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 08917619.5.0000.5426
Submetido em: 01/03/2019
Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP
Situação da Versão do Projeto: Aprovado
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio



Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_1306967

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

O Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “Avaliação da terapia fotodinâmica contra biofilmes acneicos polimicrobianos: um estudo pré-clínico”. O objetivo deste trabalho é estudar *in vitro* uma alternativa de tratamento para a acne vulgar baseado no uso da luz associado a um corante, denominada terapia fotodinâmica. Para realizar o estudo será necessário que o(a) Sr.(a) se disponibilize a doar amostras de espinhas e cravos, que serão coletadas com auxílio de instrumento chamado extrator de comedões (método este que já faz parte do procedimento de limpeza de pele e que será efetuado pela profissional capacitada). O material será utilizado exclusivamente para essa pesquisa, não podendo ser reutilizado em pesquisa posterior.

Esta pesquisa servirá como parâmetro para avaliar as melhores condições da terapia fotodinâmica para a inativação dos microrganismos relacionados à acne vulgar. Os riscos são baixos e o procedimento implica na possibilidade de desconfortos locais tais como vermelhidão e ardência da pele do rosto, em virtude das informações coletadas serem utilizadas unicamente com fins científicos, sendo garantidos o total sigilo e confidencialidade, através da assinatura deste termo, o qual o(a) Sr.(a) receberá uma cópia e se desejar, será informado sobre os resultados dessa pesquisa.

O benefício da sua participação nesta pesquisa será a limpeza da pele (procedimento que auxilia no tratamento da acne vulgar). Além disso, como benefício científico esse estudo possibilitará a determinação de parâmetros (número de aplicações e concentração do corante) adequados para eliminação microbiana e o auxílio no entendimento dos mecanismos dessa eliminação. A sua participação como voluntário terá a duração de 30 minutos e não terá nenhuma despesa ao participar

desse estudo; caso ocorra algum dano em decorrência de sua participação, o participante fará jus à reparação.

O(a) Sr.(a) terá o direito e a liberdade de negar-se a participar desta pesquisa total ou parcialmente ou dela retirar-se a qualquer momento, sem que isto lhe traga qualquer prejuízo ou punição.

Para qualquer esclarecimento no decorrer da sua participação, estarei disponível através do telefone:(16) 9 973731-26 e e-mail: sarinha_annunzio@hotmail.com. O senhor (a) também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, na Rodovia Araraquara Jaú, Km 01 – s/n, Bairro: Campos Ville, 14800-903 – Araraquara, SP, telefone (16) 3301-4657 e e-mail: sta@fctar.unesp.br.

Eu _____,
RG _____, Estado Civil _____, Idade _____ anos, residente na
_____, nº _____, Bairro _____, Cidade
_____, Telefone _____, declaro que após ter sido
esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a), lido e assinado o presente termo em duas vias,
e entendido tudo o que me foi explicado, concordo em participar da Pesquisa intitulada
“Avaliação da terapia fotodinâmica contra biofilmes acneicos polimicrobianos: um
estudo pré-clínico”.

Araraquara, ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do Pesquisador

Assinatura do Voluntário

DECLARAÇÃO

Eu, Sarah Raquel De Annunzio, pesquisadora responsável pelo Projeto de Pesquisa “Avaliação da terapia fotodinâmica contra biofilmes acneicos polimicrobianos: um estudo pré-clínico”, declaro que todas as informações ao sujeito da pesquisa serão fornecidas por mim ou pela minha equipe no momento da obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Assinatura