

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 25/05/2024.



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; PPAKONSTANTINO, 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).

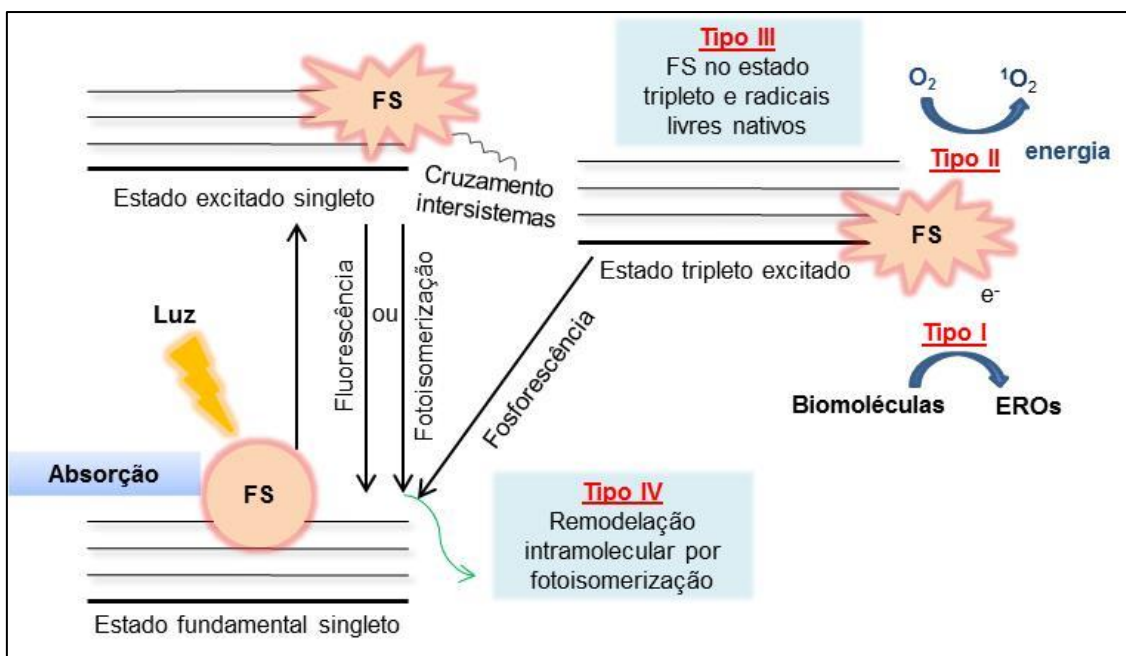


Figura 1. Diagrama de Jablonski representando os mecanismos fotodinâmicos de formação de EROs. FS: fotossensibilizador; EROs: espécies reativas de oxigênio; O₂: oxigênio; ¹O₂: oxigênio singleto. (CALIXTO *et al.*, 2019 modificado).

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).

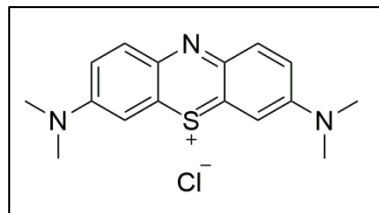


Figura 2. Estrutura molecular do azul de metileno. Fonte: Sampaio *et al.*, (2020).

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).

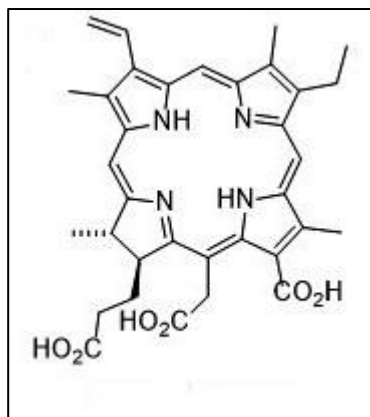


Figura 3. Estrutura molecular da clorina-e6. Fonte: Sampaio *et al.*, (2020).

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).

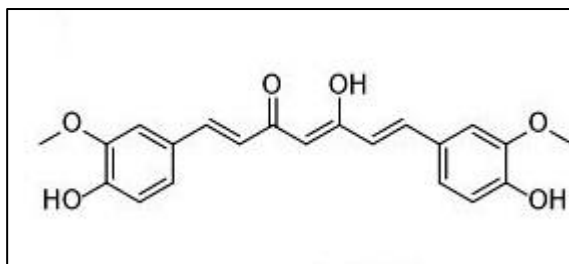


Figura 4. Estrutura molecular da curcumina. Fonte: Sampaio *et al.*, (2020).

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

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.;