



**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA
ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE**

KATIA LUMI TANIKAWA- VERGILIO

**TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA COM
FENOTIAZÍNICOS: ENSAIOS *IN VITRO* EM STAPHYLOCOCCUS *AUREUS***

São Paulo, SP

2020



KATIA LUMI TANIKAWA- VERGILIO

**TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA COM
FENOTIAZÍNICOS: ENSAIOS IN VITRO EM STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

Tese apresentada à
Universidade Nove de Julho
como requisito para obtenção
do Título de Doutor em
Biofotônica aplicada às
Ciências da Saúde

Orientadora:

Prof^a. Dra. Christiane Pavani

São Paulo, SP

2020

Vergilio, Katia Lumi Tanikawa.

Terapia fotodinâmica antimicrobiana com fenotiazínicos:
ensaios in vitro em *Staphylococcus aureus*. / Katia Lumi Tanikawa
Vergilio. 2020.

73 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Nove de Julho -
UNINOVE, São Paulo, 2020.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Christiane Pavani.

1. Fotoquimioterapia. 2. Fenotiazínicos. 3. *Staphylococcus*

SM ravlo, 15 le setemb/ode2020.

TERMO DE APROYACAO

Aluno (a): Itéta Lumi Tanikaw Veqllio

Titulo da Tese: 'Toapia fotodinâmica antimicrobiana com fenotiazínicos: ensaios in vito em St3gh}l0C0CCUS 3Ut9US'.

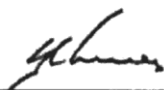
Pesidente: PROFº. DRº. ChRISTIANE PAVANI




MeMbfo: PROFº. DRº. DANIELA DE FATIMATEIXEIRA DA SILVA



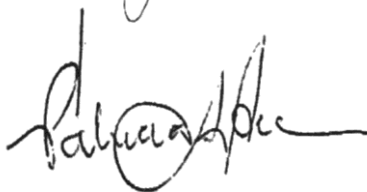
Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT ¢ARC0S



Membo: PROFº. DRº. ALESSAXORA BAPTISTS



Memb/o: PROFº. DRº. PATRICIA DAANA



Dedicatória

Dedico todas as realizações da minha vida, aos meus pais Yoko e Riozi, com reverência e honra ao amor e valores que construíram minha essência.

Dedico esta conquista aos meus amados filhos Karoline Mie e Arthur Riozi e ao meu marido Luis Alexandre , a eles declaro todo o amor incondicional, razões da minha existência.

Homenagem

Aos meus eternos mestres inspiradores:

Profa. Dra. Dolores Ursula Mehnert

Profa. Dra. Silvana Cai

Prof. Dr. Mário Júlio Ávila Campos (in memorian)

Agradecimentos

Gratidão a Deus, a Nossa Senhora, por me guiarem com fé e sabedoria em todos os caminhos da minha vida.

Sou grata...

À minha querida orientadora Profa Dra. Christiane Pavani por todos os valiosos abraços, ensinamentos, dedicação e por sempre me incentivar e acreditar que eu seria capaz de superar os obstáculos que a vida me apresentou.

À profa. Dra. Kristianne Porta dos Santos pela amizade e consideração, demonstrados com tanto carinho.

À profa. Dra. Sandra Kalil Bussadori pelo despertar e incentivo à pesquisa científica desde os meus tempos acadêmicos...

À querida profa. Dra. Daniela Teixeira pelas valiosas contribuições em todo o processo, com seu carinhoso olhar e ternos gestos de solidariedade.

Aos meus “príncipes”, “filhos da Katinha”: Braz Bellemo (filho biológico), Dennys Pinheiro (filho mais perfeito), Josias de Paula Junior (filho preferido), Bruno Coelho (filho primogênito), que compartilharam comigo inúmeros desafios e muito trabalho, sempre com tanto amor e alegria. Obrigada pela linda família que nos tornamos...

À Núbia e Haryane por toda paciência com nosso grupo.

À Regina Barreiros e toda equipe do Laboratório de Biociências pelo companheirismo e convívio afetivo.

Aos meus queridos alunos, que me motivam a trilhar novos caminhos.

Aos meus familiares e amigos, gratidão emocional por sempre estarem ao meu lado.

RESUMO

Staphylococcus aureus é associado a infecções adquiridas, considerado um dos principais patógenos humanos, devido à sua fácil disseminação e resistência aos antibióticos. A Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) utiliza fonte de luz em combinação com um fotossensibilizador (FS) para induzir uma reação fototóxica, produzindo espécies reativas de oxigênio que podem destruir lipídios e proteínas causando a morte celular. O efeito da aPDT está relacionado a várias propriedades físicas, químicas e biológicas específicas do FS. Os corantes fenotiazínicos mostram elevada absorção na região vermelha do espectro eletromagnético (600–680 nm). Estudos avaliando a ação dos FS Azure A (AA), Azure B (AB) e Dimetil azul de metileno (DMAM) em comparação ao azul de metileno (AM), além de estabelecer a relação entre a eficácia e a agregação dos compostos (metacromaticidade), podem sugerir novas estratégias para aumentar a eficácia da aPDT. O objetivo deste estudo foi comparar a eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana com fenotiazínicos na redução do crescimento *in vitro* de *S. aureus*. As unidades formadoras de colônias foram determinadas para cada FS testado em diversas concentrações e também as amostras foram submetidas a tratamento aPDT (11,2 mW/cm², 4,7 J/cm² por 7 minutos) utilizando o sistema LED 660nm (BioLambda[®], Brasil). A avaliação de incorporação foi realizada em ensaios de quantificação por espectrofotometria dos FS em *S. aureus*. Em todas as análises, os dados foram submetidos ao ensaio não paramétrico de Kruskal-Wallis e a comparação entre as médias foi realizada por teste de Student-Newman-Keuls, através do programa Biostat, e considerando um nível global de significância de 95% ($\alpha=0,05$). Dentre os fenotiazínicos testados neste estudo, DMAM apresentou os melhores resultados, com melhor incorporação celular bacteriana contribuindo para a ligação celular e dispersão intracelular em *S. aureus*, e eficaz ação antimicrobiana, além de demonstrar intensa absorção de luz no comprimento de onda de excitação em menor faixa de concentração, assegurando a possibilidade de toxicidade para seres humanos.

Palavras- Chave: fotoquimioterapia; fenotiazínicos; *Staphylococcus aureus*; fármacos fotossensibilizantes; Azul de Metileno.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is associated with acquired infections, considered one of the main human pathogens, due to its easy dissemination and resistance to antibiotics. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) uses a light source in combination with a photosensitizer (FS) to induce a phototoxic reaction, producing reactive oxygen species that can destroy lipids and proteins causing cell death. The effect of aPDT is related to several physical, chemical and biological properties specific to FS. Phenothiazine dyes show high absorption in the red region of the electromagnetic spectrum (600–680 nm). Studies evaluating the action of FS Azure A (AA), Azure B (AB) and Dimethyl methylene blue (DMAM) compared to methylene blue (AM), in addition to establishing the relationship between the effectiveness and aggregation of compounds (metachromaticity), may suggest new strategies to increase the effectiveness of aPDT. The purpose of this study was to compare the effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy with phenothiazines in reducing in vitro growth of *S. aureus*. Colony-forming units were determined for each FS tested in different concentrations and the samples were also submitted to aPDT treatment (11.2mW / cm², 4.7 J / cm² for 7 minutes) using the 660nm LED system (BioLambda®, Brazil). The incorporation evaluation was performed in quantification tests by spectrophotometry of the FS in *S. aureus*. In all analyzes, the data were subjected to the Kruskal-Wallis non-parametric test and the comparison between the means was performed by the Student-Newman-Keuls test, through the Biostat program, and considering a global level of significance of 95% ($\alpha = 0.05$). Among the phenothiazines tested in this study, DMAM showed the best results, with better bacterial cell incorporation, contributing to the cellular binding and intracellular dispersion in *S. aureus*, and effective antimicrobial action, in addition to demonstrating intense light absorption in the excitation wavelength lower concentration range, ensuring the possibility of toxicity to humans.

Key words: photochemotherapy; phenothiazines; *Staphylococcus aureus*; photosensitizing agents; Methylene Blue

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AA – Azure A

AB - Azure B

AM – Azul de Metileno

aPDT- do inglês *Antimicrobial Photodynamic Therapy*: Terapia Fotodinâmica antimicrobiana

AT- Azul de Toluidina

BHI – do inglês *Brain Heart Infusion* – Infusão de Cérebro Coração

CDIs- dispositivos cardíacos

CLSM- do inglês *Confocal Laser Scanning Microscopy* - Microscopia Confocal de Varredura a Laser

D/M – Dímero/ Monômero

DMAM – Dimetil azul de metileno

eDNA- DNA extra celular

EDTA – do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*: ácido etilenodiamino tetraacético

EPS- do inglês *extracellular polymeric substance*: substâncias poliméricas extracelulares

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FS – fotossensibilizante

LED – do inglês *Light Emitting Diode*: Diodo emissor de luz

LPS- lipopolissacarídeo

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

MRSA - do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

MSSA - do inglês *Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*: *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina

NADH - Dinucleótido de nicotinamida e adenina PBS - do

inglês *Phosphate buffer saline*: tampão fosfato salino pH-

potencial Hidrogeniônico

PSD – do inglês *Polymicrobial Synergy and Dysbiosis*: Sinergia polimicrobiana e disbiose

SRP- do inglês *Scaling and Root Planing*: Raspagem e Alisamento Radicular

TNF- α - do inglês *Tumor Necrose Factor* -Fator de necrose tumoral alfa

TSB- do inglês *Tryptic Soy Broth*: Caldo de Soja Trípico

UFC - Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA E SÍMBOLOS

μL - microlitro

cm^2 – centímetro quadrado

h- hora

J- Joule

L- litro

min- minuto(s)

mg- miligrama

mL- mililitro

mW- miliwatts

nm- nanometro

$^{\circ}\text{C}$ – graus centígrados

s - segundo

W – watts

λ - comprimento de onda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A. Representação do arranjo estafilococo em aspecto de cachos (https://br.images.search.yahoo.com/images/view;_ylt=AwrJ3s8AxCtdHOMAVE316Qt, acesso em 10/07/2019). B. Representação esquemática da divisão em três planos na formação do arranjo estafilocócico. 19

Figura 2. Aspectos microbiológicos da morfologia de *Staphylococcus aureus*. A. Coloração de Gram e observação em microscopia óptica com óleo de imersão (aumento de 1000x) de *S. aureus* demonstrando bactérias gram-positivas agrupadas em cachos ou aglomerados de células arredondadas (cocos). B. Aspecto de cor amarelo-ouro das Unidades Formadoras de Colônias de *S. aureus* em ágar BHI. (<https://www.laboratuvar.com/images/Staphylococcus-Aureus-Koaglaz-Pozitif-Staphylococ.jpg>, acesso em 10/07/2019). 20

Figura 3. Representação da parede celular de *S. aureus*: rígida e espessa; resistente a antimicrobianos e imunidade por polissacarídeos que inibem a quimiotaxia e fagocitose. (<https://williamenatashabioifes.files.wordpress.com/2011/04/gram-positivo1.jpg?w=584>, acesso em 02/07/2020). 21

Figura 4. Representação esquemática da ação da PDT por meio da combinação de luz e um agente fotossensibilizante na presença de oxigênio, produzindo radicais livres e oxigênio singlete e promovendo efeito citotóxico como a destruição de microrganismos. 28

Figura 5. Diagrama de Jablonski (<http://infinito-e-diversos-els.blogspot.com/2011/11/diagrama-de-jablonski.html>. Acesso em 22/11/2019). 28

Figura 6. Estrutura molecular de alguns corantes fenotiazínicos. Azul de metileno, Azul de O-Toluidina, Dimetil azul de metileno, Azure A, Azure B. ^{64,65} 31

Figura 7. Espectros de absorção de solução de AM em água deionizada nas concentrações de 250µg/mL (eixo da esquerda), 20 e 10 µg/mL (eixo direito)⁷² 34

Figura 8: Representação esquemática da ativação microbiana do inóculo padrão (3×10^8 UFC *S. aureus* /mL) em veículo água milli-Q. 45

Figura 9: Inóculo bacteriano foi testado com os FS AA, AB e AM (20, 40, 100 e 200 mg/L), e DMAM (2,4,10 e 20 mg/L). Como controle foi utilizada água milli-Q estéril. As microplacas foram incubadas a 37° C no escuro por 5 minutos, e depois aguardaram o período de 7 minutos em temperatura ambiente e no escuro. Diluição seriada (10⁻¹ a 10⁻⁵) de cada amostra foi realizada, seguida da Semeadura em placas de meio BHI 1% sacarose. 46

Figura 10: Representação esquemática das amostras de suspensão bacteriana nos veículo água milli-Q adicionadas aos FS AA, AB e AM nas concentrações de 20, 40, 100 e 200 mg/L, e 2,4,10 e 20 mg/L de DMAM, incubadas no escuro a

37°C e tratamento aPDT em LED 660nm (BioLambda®) (11,2mW/cm²; 4,7 J/cm² por 7 minutos). Após o tratamento fotodinâmico, as amostras foram diluídas em série e semeadas em meio ágar BHI 1% sacarose..... 47

Figura 11. Avaliação da toxicidade dos FS no escuro em suspensão de *S. aureus* no veículo água milli-Q, por 30 minutos no escuro (ausência de terapia fotodinâmica), n=9. O inóculo bacteriano isento de agente FS foi considerado Controle (CT). A) AA: as concentrações de 0 e 10 mg/L apresentaram estatisticamente os maiores valores, e as concentrações de 50 e 100mg/L os menores valores, a concentração de 20 mg/L foi significativamente diferente apenas da concentração de 10 mg/L.; B) AB: todas as concentrações apresentaram número similar de UFC; C) AM: em todas as concentrações avaliadas não foi verificada ação antimicrobiana significativa em relação ao grupo Controle; D) DMAM: todas as concentrações apresentaram número similar de UFC, exceto a concentração de 5 mg/L que foi estatisticamente menor..... 50

Figura 12. Avaliação da aPDT em suspensão de *S. aureus* no veículo água milli-Q sob o parâmetro de 11,2mW/cm² 4,7 J/cm², por 7 minutos. n=9. O inóculo bacteriano isento de agente FS foi considerado Controle (0). A) AA: a concentração de 0 mg/L (Controle) foi estatisticamente maior que todos os outros grupos, que foram semelhantes entre si; B) AB: as concentrações de 20 a 100mg/L apresentaram menores UFC que nas concentrações de 0 e 10mg/L a concentração de 0mg/L(Controle) estatisticamente apresentou o maior valor, as concentrações de 10 e 20mg/L apresentaram os menores valores, com nenhuma formação de colônia, a concentrações de 50 mg/L foram similares a todas as outras, exceto ao controle e a concentração de 100 mg/L apresentou valor intermediário sendo estatisticamente semelhante apenas a concentração de 50 mg/L; C) AM: as concentrações de 20 a 100mg/L apresentaram menores UFC que nas concentrações de 0 e 10mg/L; D) DMAM: a concentração de 0mg/L (Controle) apresentou o maior valor e todas as demais concentrações foram significativamente menores que o controle e similares entre si, com 0 log UFC/mL 52

Figura 13. Quantificação por espectrofotometria de incorporação dos corantes fenotiazínicos AM(8,9%), AA(30,7%), AB(42,3%) e DMAM(86,9%) a 20mg/L em SDS a 0,25% com 3x 10⁸ UFC/mL. Cada FS foi quantificado no seu λ máximo, sendo o AM em 664 nm, AA em 630 nm, AB em 645 nm e DMAM em 653 nm. N=9..... 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mediana, valores mínimos e máximos do log das UFC/mL em amostras utilizando o corante AA em diferentes concentrações sob o tratamento de PDT e no escuro. Ao menos uma letra igual entre os grupos indica ausência de diferenças estatística.....	54
Tabela 2. Mediana, valores mínimos e máximos do log das UFC/mL em amostras utilizando o corante AB em diferentes concentrações sob o tratamento de PDT e no escuro. Ao menos uma letra igual entre os grupos indica ausência de diferenças estatística.....	55
Tabela 3: Mediana, valores mínimos e máximos do log das UFC/mL em amostras utilizando o corante AM em diferentes concentrações sob o tratamento de PDT e no escuro. Ao menos uma letra igual entre os grupos indica ausência de diferenças estatística.....	55
Tabela 4: Mediana, valores mínimos e máximos do log das UFC/mL em amostras utilizando o corante DMAM em diferentes concentrações sob o tratamento de PDT e no escuro. Ao menos uma letra igual entre os grupos indica ausência de diferenças estatística.....	56
Tabela 5: Média e desvio padrão do log das UFC/mL em amostras utilizando quatro corantes em diferentes concentrações sob o tratamento de PDT	73
Tabela 6: Média e desvio padrão do log das UFC/mL em amostras tratadas no escuro utilizando quatro corantes em diferentes concentrações.	74

Sumário

1. CONTEXTUALIZAÇÃO	18
1.1 Introdução.....	18
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	19
1.2.1 Aspectos microbiológicos	19
1.2.2. Disbiose	21
1.2.3. Virulência	22
1.2.4. Resistência aos Antibióticos.....	25
1.3. Terapia fotodinâmica (PDT).....	27
1.3.1 Corantes fenotiazínicos	31
Agregação ou Metacromaticidade	33
1.3.2 Fontes de Irradiação.....	36
1.4. aPDT e FS fenotiazínicos: Estado da Arte.....	37
2. OBJETIVOS	42
2.1 Objetivos Gerais	42
2.2. Objetivos Específicos	42
3. METODOLOGIA.....	43
3.1. Preparo de soluções	43
3.1.1. Meios de cultura	43
3.1.2. Outras soluções.....	43
3.2 Ensaios Biológicos	44
3.2.1 Ensaios Biológicos em suspensão	44
3.2.1.1 Avaliação da toxicidade dos FS fenotiazínicos (AM, AA, AB e DMAM) no escuro	44
3.2.1.2 Avaliação da aPDT com FS fenotiazínicos (AM, AA, AB e DMAM) em <i>Staphylococcus aureus</i>	46
3.2.1.3 Incorporação dos Fenotiazínicos em <i>S. aureus</i>	48
3.3. Análise Estatística	48
4. RESULTADOS	49
4.1. Avaliação da toxicidade dos FS fenotiazínicos (AM, AA, AB e DMAM) no escuro	49
4.2. Avaliação da aPDT com FS fenotiazínicos (AM, AA, AB e DMAM) em S. aureus.....	51
4.3. Avaliação da eficácia dos fenotiazínicos	54

4.3.1. Comparação das diferentes concentrações do corante AA nos tratamentos aPDT e escuro.....	54
4.3.2. Comparação das diferentes concentrações do corante AB nos tratamentos aPDT e escuro.....	54
4.3.3. Comparação das diferentes concentrações do corante AM nos tratamentos aPDT e escuro.....	55
4.3.4. Comparação das diferentes concentrações do corante DMAM nos tratamentos aPDT e escuro.....	56
4.4 INCORPORAÇÃO DE FENOTIAZÍNICOS.....	57
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÃO.....	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Introdução

Bactérias que existem no meio ambiente e nas microbiotas residentes dos organismos vivos podem produzir toxinas, que são nocivas para as células humanas e se um indivíduo não dispuser de uma resposta imune satisfatória contra elas, o resultado é a doença infecciosa.

Doenças infecciosas representam importante causa de morbidade e mortalidade entre seres humanos, especialmente nos países em desenvolvimento como o Brasil. A descoberta dos antibióticos na década de 1930 revolucionou a medicina e mudou o tratamento dessas doenças, resultando no significativo aumento na expectativa e na qualidade de vida da humanidade.

As infecções adquiridas fora do meio hospitalar são, de forma geral, controladas com o uso de antibióticos. No entanto, isso não acontece com as infecções adquiridas em ambiente hospitalar, pois muitos dos microrganismos que vivem nos hospitais apresentam resistência microbiana. Portanto, desde que a antibioticoterapia fora introduzida, a resistência microbiana também evoluiu muito rapidamente.¹

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é um agente etiológico importante associado a infecções adquiridas, tanto na comunidade como em hospitais, e que se tornou um paradigma das infecções bacterianas. Considerado um dos principais patógenos humanos, destaca-se por incidência em casos de infecções tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto em saudáveis, devido à sua fácil disseminação intra-hospitalar associada à resistência aos antibióticos.²

A utilização de luz e corantes para a inativação de microrganismos tem sido proposta na prática clínica, devido à resistência bacteriana aos antibióticos. Como até o momento não existem evidências de resistência microbiana à Terapia Fotodinâmica (PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*), esta modalidade terapêutica tem sido uma alternativa antimicrobiana bastante promissora e é o tema escolhido para esse trabalho.

1.2. *Staphylococcus aureus*

1.2.1 Aspectos microbiológicos

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcae*, juntamente como os gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. Atualmente, o gênero *Staphylococcus* possui 33 espécies, sendo 17 delas, comumente isoladas de amostras biológicas humanas.³⁻⁵

S. aureus é espécie bacteriana de grande interesse biológico por estar relacionada à etiologia de infecções nosocomiais e comunitárias.⁶⁻⁹ Essa espécie foi descrita pela primeira vez em 1880, em amostra de exsudato purulento de abscessos cirúrgicos, pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston e continua considerado um dos microrganismos mais comumente isolado nas infecções piogênicas de humanos.^{7,10}

A espécie foi denominada *S. aureus* devido à pigmentação das colônias cor amarelo-ouro. A coloração dessas colônias varia desde o acinzentado até o amarelo-ouro, em que a pigmentação aumenta com o tempo de incubação prolongado, não chegando a ser formada nos casos de crescimento em condições anaeróbicas, ou na cultura em caldo.¹¹

São cocos Gram e catalase-positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados. Essa bactéria pode apresentar-se em diversas formas, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente (com aspecto semelhante a um cacho de uvas), devido à sua divisão celular, que ocorre em três ou mais planos, como ilustra a Figura 1 (A e B).³⁻⁵

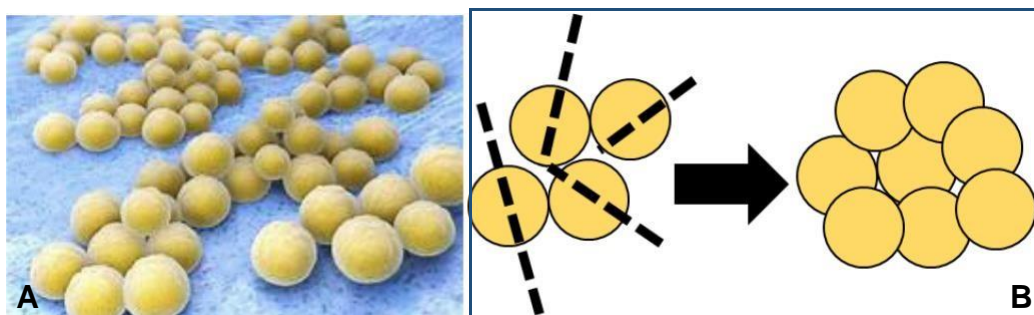


Figura 1. A. Representação do arranjo estafilococo em aspecto de cachos (https://br.images.search.yahoo.com/images/view;_ylt=AwrJ3s8AxCtdHOMAVE316Qt,

acesso em 10/07/2019). B. Representação esquemática da divisão em três planos na formação do arranjo estafilocócico.

As cepas de *S. aureus* crescem em meios comuns, caldo ou ágar simples, pH = 7, à temperatura ótima de 37°C. As colônias formadas em placa, após 18-24 horas de incubação, apresentam-se arredondadas, lisas e brilhantes (Figura 2B).

Atualmente é um dos microrganismos mais comuns nas infecções purulentas em todo o mundo. Esta bactéria é frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis, sendo o próprio ser humano seu principal reservatório.⁶⁻⁹ Apesar de integrantes da microbiota do corpo, são microrganismos causadores de diversas patologias e um dos gêneros mais estudados pela microbiologia. *S. aureus* detém importância por se relacionarem a infecções hospitalares e alimentares, causando desde uma simples infecção (espinha, furúnculos e celulites) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, gangrena Fournier, septicemia e outras).⁶⁻⁹

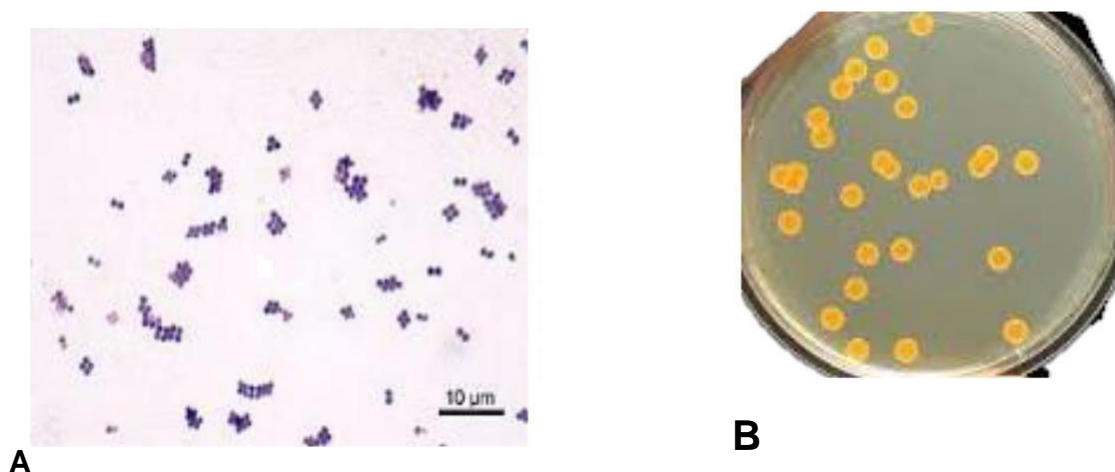


Figura 2. Aspectos microbiológicos da morfologia de *Staphylococcus aureus*. A. Coloração de Gram e observação em microscopia óptica com óleo de imersão (aumento de 1000x) de *S. aureus* demonstrando bactérias gram-positivas agrupadas em cachos ou aglomerados de células arredondadas (cocos). B. Aspecto de cor amarelo-ouro das Unidades Formadoras de Colônias de *S. aureus* em ágar BHI. (<https://www.laboratuvar.com/images/Staphylococcus-Aureus-Koaglaz-Pozitif-Staphylococ.jpg>, acesso em 10/07/2019).

A parede celular dos estafilococos (Figura 3) é constituída por camada frouxa de polissacarídeos que protege as bactérias ao inibir a quimiotaxia e fagocitose, facilita a aderência a materiais sintéticos e é rica em peptideoglicanos que conferem maior rigidez à parede. É um microrganismo que tem a capacidade de se adaptar rapidamente a diferentes ambientes, muitas vezes hostis devido ao pH, umidade, pressão osmótica ou deficiência de nutrientes.^{8,12}

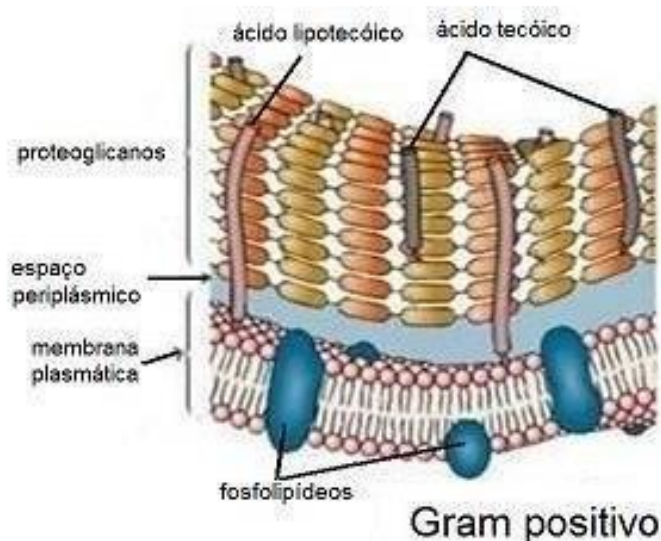


Figura 3. Representação da parede celular de *S. aureus*: rígida e espessa; resistente a antimicrobianos e imunidade por polissacarídeos que inibem a quimiotaxia e fagocitose. (<https://williamenatashabioifef.files.wordpress.com/2011/04/gram-positivo1.jpg?w=584>, acesso em 02/07/2020).

1.2.2. Disbiose

Um dos principais requisitos para uma comunidade potencialmente patogênica surgir envolve a capacidade de certas espécies, denominadas "patógenos - chave", modularem a resposta do hospedeiro, diminuindo a vigilância imunológica e equilíbrio da homeostase, levando à disbiose. Os "patógenos - chave" também aumentam a virulência de toda a comunidade microbiana através de uma comunicação interativa com agentes patogênicos acessórios.^{13–15}

Outras ações importantes para a patogenicidade dependem da expressão de diversas moléculas (adesinas, receptores cognatos, enzimas proteolíticas),

que em combinação atuam como fatores de virulência para sustentar nutricionalmente uma comunidade microbiana heterotípica, compatível e pró-inflamatória que induz uma resposta não-resolutiva e destrutiva. Com base nos conceitos fundamentais subjacentes da patogênese, isto é sinergia polimicrobiana e disbiose, este modelo é denominado PSD (do inglês *Polymicrobial Synergy and Dysbiosis*).^{15–17}

Pereira *et al*¹⁸ relataram a interferência no sinergismo da microbiota bacteriana local por meio da inativação fotodinâmica e FS azul de metileno (AM) amostras de feridas na Gangrena de Fournier. FG (do inglês *Fournier's Gangrene*) é uma doença infecciosa polimicrobiana que ocasiona necrose fasciitis na região genital, períneo e região perianal. O mecanismo de ação patogênico sinérgico das espécies *Clostridium perfringens*, *S. aureus* e *Escherichia coli* tem sido relacionado à maior velocidade de disseminação do processo infeccioso.

1.2.3. Virulência

S. aureus é patógeno humano oportunista, com capacidade de escapar dos mecanismos de defesa imunológicos e causar uma variedade de infecções. As infecções por *S. aureus* podem resultar em processo altamente dinâmico com ampla disseminação, variando de lesões superficiais da pele, passando por abscessos profundos até sepse com risco de vida.

Muitos fatores potencialmente virulentos são expressos por esse patógeno: (1) proteínas de superfície que promovem a colonização de tecidos do hospedeiro; (2) fatores de superfície que inibem a atividade fagocítica (cápsula, proteína A); (3) propriedades bioquímicas que realçam sua sobrevivência nos fagócitos (como a produção de catalase); (4) proteção contra resposta imune (proteína A, coagulase); (5) toxinas prejudiciais à membrana promovendo lise de membranas de células eucariontes (hemolisinas, leucotoxinas, leucocidinas); (6) exotoxinas que provocam danos aos tecidos do hospedeiro, (7) resistência inerente e adquirida aos agentes antimicrobianos.¹⁹

A diversidade patogênica do *S. aureus* desafia a compreensão dos mecanismos infecciosos deste microrganismo na resposta imunológica. Na invasão infecciosa, a reação imune é iniciada por macrófagos e a liberação de citocinas para convocar neutrófilos. Fibrose também ocorre, assim como a morte

de muitas das células imunes que conduzem aos abscessos purulentos. *S. aureus* também pode escapar regularmente dos locais de infecção locais e se disseminar ainda mais. Se entrar na corrente sanguínea, pode levar à sepse, bem como à invasão de outros órgãos, onde outras infecções locais também podem ocorrer.²⁰

A capacidade de formar um biofilme é considerada um fator de virulência, uma vez que a produção de poli-N-acetil-glucosamina de superfície está associada a estágios iniciais de colonização e contribui para a evasão do sistema imunológico e aumento da resistência à fagocitose e antibióticos, causando bacteremia e infecções persistentes.^{21,22}

Em comparação com as bactérias planctônicas, as bactérias produtoras de biofilme têm um fenótipo diferente e sua expressão gênica, bem como a síntese de proteínas, são notavelmente diferentes. Além disso, a espessura de um biofilme pode variar de uma camada celular muito fina e única a uma estrutura maciça e multidimensional coberta com um meio polimérico viscoso.²³

A matriz extracelular pode ser composta de água, polissacarídeos, células microbianas e outros produtos extracelulares que podem afetar sua integridade e estabilidade estrutural. Além disso, o DNA extracelular (eDNA) parece ser um dos componentes cruciais do biofilme que desempenha um papel fundamental na adesão do biofilme, transferência de genes e sobrevivência adicional. Por exemplo, como uma molécula aniônica, pode ligar peptídeos antimicrobianos (AMPs) produzidos pelo sistema imunológico ou outros antibióticos catiônicos, como os aminoglicosídeos. Para *S. aureus*, o eDNA foi considerado um dos principais componentes estruturais do biofilme e provavelmente desempenha um papel fundamental na sua formação e virulência *in vivo*.^{23–29}

Curiosamente, a presença de eDNA não é acidental. Alguns estudos indicam que ele pode ser secretado por células metabolicamente ativas ou pode ser obtido usando autólise controlada. *S. aureus* mostra uma capacidade única de formar um biofilme na superfície de dispositivos protéticos. Quando esses dispositivos são implantados no sistema endovascular, eles são cobertos pelas proteínas hospedeiras, como fibrina, fibronectina, fibrinogênio e colágeno. Além disso, *S. aureus* adere à sua superfície inicialmente por meio de interações

eletrostáticas, forças de van der Waals e ligações de hidrogênio com ligação posteriormente mais estável devido às proteínas bacterianas da família MSCRAMM (componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas da matriz adesiva).^{23–30}

A proteína A é uma MSCRAMM responsável pela ligação à fibronectina FnBPA que permite que o *S. aureus* se ligue a uma superfície coberta por fibronectina de dispositivos externos e promove a adesão às células e tecidos da mucosa. O primeiro grupo de infecções relacionadas à formação de biofilme em próteses são infecções por dispositivos cardíacos (CDIs) que são comumente associadas ao implante de marcapassos permanentes (PPMs) ou desfibriladores cardioversores implantáveis. As infecções por cateteres intravasculares, que são uma causa comum de sepse e terapia antimicrobiana intravascular prolongada, são outro grupo importante de infecções características da invasão estafilocócica.^{23–30}

Barat³¹, avaliou biofilmes de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) por microscopia confocal de varredura a laser (CLSM), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por densidade óptica multimodo Synergy 2 (comprimento de onda de 490 nm e 0,1% Safranina) o crescimento bacteriano *in vivo* em amostras obtidas de tubo endotraqueal (ETT) da intubação em porcos e comparou ao desenvolvimento *in vitro* da mesma cepa em placas de microtitulação e meio nutriente de caldo de soja trípico (TSB) 0,25% glicose, em ambiente laboratorial. Este estudo demonstrou que a intubação endotraqueal aumentou significativamente a capacidade de uma cepa de MRSA em formar biofilmes, e não por influência do tratamento sistêmico recebido durante a intubação. Esse achado é de relevância clínica, porque um fraco produtor de biofilme *in vitro* pode se tornar um forte produtor de biofilme *in vivo*. Foi notável que essa capacidade tenha revertido significativamente para o nível basal após vários dias de passagem da placa de cultura, sugerindo que o microambiente dentro de um ETT aprimora a formação de biofilme. Assim, o fenótipo de biofilme *in vitro* em placas de microtitulação não representa obrigatoriamente o fenótipo de biofilme *in vivo* de uma cepa específica.

1.2.4. Resistência aos Antibióticos

Considera-se que há três condições para que um antibacteriano iniba ou elimine uma bactéria: I) a existência de um alvo, II) o antibacteriano deve ter a capacidade de atingir o alvo e III) não pode ser inativado antes de atingi-lo. As bactérias podem ser classificadas como sensíveis ou resistentes a antibióticos. Em geral classificam-se como resistentes as bactérias que crescem *in vitro*, nas concentrações em que o antibiótico atinge no sangue quando administrados nas recomendações de uso clínico. A resistência pode ser natural ou adquirida. O antimicrobiano não induz a resistência, mas seleciona as bactérias mais resistentes existentes em uma população.³²

A aquisição de resistência microbiana aos antibióticos pode ocorrer através de mutações e a aquisição de plasmídeos R por diferentes mecanismos químicos, podendo também produzir enzimas que modificam a parte ativa da molécula do antibacteriano, tornando-o praticamente inativo, ou ainda, sintetizar novas enzimas que não sofrem a ação do antibacteriano e que possuem a mesma atividade metabólica das enzimas que são inativadas pelo mesmo. Mecanismos como a diminuição da permeabilidade da célula bacteriana, alterações de moléculas onde se aderem os antibacterianos, e expulsão do antibacteriano do interior da célula também conferem resistência às drogas antimicrobianas.^{1,33}

A aquisição de resistência por uma bactéria sensível é decorrente de uma alteração genética que se expressa bioquimicamente. As alterações genéticas podem ser originadas de mutações cromossômicas, pela aquisição de plasmídeos de resistência ou por transposons. A resistência mediada por mutações é geralmente simples, isto é, atinge apenas um antibacteriano, porque dificilmente uma bactéria sofre mutações simultâneas para dois ou mais antibacterianos. A mediada por plasmídeos de resistência pode ser simples, mas na maioria das vezes é múltipla, tornando as bactérias resistentes a dois ou mais antibióticos. Isto se deve a presença de genes de resistência, para diferentes antibacterianos, em um só plasmídeo. Pode-se ter também a presença de dois ou mais plasmídeos de resistência diferentes numa mesma bactéria. Tanto a resistência cromossômica como a extracromossômica podem ser transferidas de uma bactéria para outra.³⁴

Alguns mecanismos químicos que podem tornar as bactérias resistentes: produção de enzimas que codificam a molécula do antibacteriano tornando-o inativo; diminuição da permeabilidade à entrada de antibacterianos; alteração do alvo: síntese de novas enzimas que não sofrem ação do antibacteriano; expulsão do antimicrobiano da bactéria.³⁵

A descoberta de antimicrobianos peptídicos oferece uma ótima oportunidade para combater microrganismos patogênicos. A aquisição de resistência para antimicrobianos peptídicos em amostras susceptíveis é mais lenta e menos comum quando comparado com outros agentes antimicrobianos. As cargas positivas e a habilidade para adotar uma estrutura anfipática são as propriedades que realçam a afinidade dos peptídeos com os fosfolípidios carregados negativamente da superfície da membrana das bactérias. Os peptídeos interferem com a integridade da membrana e assim podem afetar seus alvos citoplasmáticos. Em vertebrados, antimicrobianos peptídicos são sintetizados e secretados por células fagocíticas e células epiteliais e contribuem para a resposta imune inata.¹⁹

O aumento dos problemas relacionados a microrganismos resistentes é particularmente importante quando existe alteração na resposta imune, como consequência de terapias imunossupressoras ou uma síndrome de imunodeficiência. A capacidade do *S. aureus* em desenvolver resistência a antibióticos é bastante relatada na literatura.^{36–39}

Infecções mais graves associadas a *S. aureus* incluem bacteremia, pneumonia, endocardite, infecções ósseas e articulares, e síndrome do choque tóxico. *S. aureus* também pode ser responsável por surtos de intoxicação alimentar. Para estes casos, o uso de antibióticos é a terapia de eleição convencional.^{38,40} No entanto, o uso desses agentes pode se tornar ineficaz pelo desenvolvimento de resistência no organismo alvo.^{39–41}

A vancomicina e antibióticos glicopeptídicos são opções efetivas no tratamento de infecções por *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA). Muitas infecções hospitalares são provocadas por *S. aureus* e eles são capazes de adquirir resistência a uma variedade de antibióticos. Alguns são resistentes a quase todos antibióticos úteis clinicamente com exceção da vancomicina, mas já existem relatos de amostras de *S. aureus* vancomicina-resistentes. A

resistência a metilina se difunde com rapidez, pois as bactérias se multiplicam rapidamente e levam consigo tal característica.

Um plasmídeo associado com a resistência a vancomicina foi detectado em *Enterococcus faecalis* que pode ser transferido ao *S. aureus* no laboratório. Existem evidências que esta transferência pode ocorrer naturalmente (por exemplo, no trato gastrointestinal). Além disso, a resistência do *S. aureus* aos antisépticos e aos desinfetantes, tais como compostos de amônia quaternária, pode ajudar na sua sobrevivência no ambiente hospitalar.^{19,42}

Atualmente, embora existam algumas terapias alternativas eficazes no tratamento de infecções mediadas por microrganismos resistentes, a busca contínua por novas terapias é imperativa. A atividade de foto-inativação tem sido estudada contra várias bactérias patogênicas incluindo cepas de MRSA.⁹

A utilização de luz e corantes para a inativação de microrganismos tem sido proposta na prática clínica, devido à resistência bacteriana aos antibióticos. Nesta revisão de literatura não foram encontradas evidências de resistência microbiana à PDT até o momento, esta modalidade terapêutica tem sido uma alternativa antimicrobiana bastante promissora.

1.3. Terapia fotodinâmica (PDT)

A PDT é uma modalidade de tratamento clínico com potencial aplicação na eliminação de células indesejadas, incluindo microrganismos.^{17,43–46} A PDT age por meio da combinação de luz e um agente fotossensibilizante (FS) na presença de oxigênio.^{43,45}

O FS é excitado por meio da exposição à luz de comprimento de onda adequado, em que exista máxima absorção pelo FS (Figura 4). Duas vias de mecanismos oxidativos são responsáveis pela inativação das células-alvo. O mecanismo do tipo I envolve a geração de radicais livres como os radicais hidroxila e o ânion radical superóxido. A via do tipo II envolve a geração de oxigênio no estado singleto. As vias do tipo I e do tipo II ocorrem simultaneamente, no entanto, a relação entre estas duas vias depende dos tipos de FS empregado e também do microambiente em que o mesmo está inserido.^{47,48} Desta forma, radicais livres e oxigênio singleto são as moléculas

produzidas por meio deste processo que promovem o efeito citotóxico da PDT, causando a oxidação de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, levando à perda de função de organelas celulares, resultando na morte celular.^{44–46}



Figura 4. Representação esquemática da ação da PDT por meio da combinação de luz e um agente fotossensibilizante na presença de oxigênio, produzindo radicais livres e oxigênio singlete e promovendo efeito citotóxico como a destruição de microrganismos.

Em 1933, o físico polonês Aleksander Jablonski propôs um diagrama de nível de energia na tentativa de descrever a luminescência, fenômeno típico de compostos orgânicos. O diagrama de Jablonski é uma representação mais complexa dos processos fotofísicos envolvidos na PDT, incluindo transições vibrônicas⁴⁹.

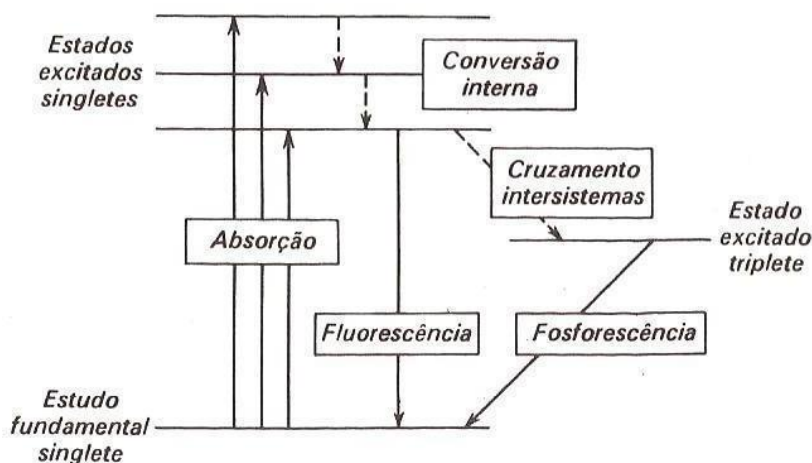


Figura 5. Diagrama de Jablonski (<http://infinito-e-diversos-els.blogspot.com/2011/11/diagrama-de-jablonski.html>. Acesso em 22/11/2019).

A absorção de um quantum de luz conduz a uma transição de um estado fundamental singlete a um estado excitado singlete (Figura 5). Existe um estado triplete de energia um pouco menor que a do estado excitado singlete. Na excitação eletrônica, um elétron de uma ligação por par de elétrons é excitado a um estado de maior energia. Se o elétron excitado tiver um spin antiparalelo ao de seu companheiro, o estado excitado será um singlete, porém, se o spin do elétron excitado for paralelo ao seu companheiro, o estado será um triplete.

Logo após a absorção da luz, uma série de eventos extremamente rápidos ocorre antes que qualquer reação fotoquímica ou emissão de radiação luminescente possa ocorrer. Um deles, chamado de conversão interna é uma transição não radiativa (sem emissão de luz) entre dois estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin. Ela ocorre, por exemplo, logo após a absorção da luz e obtenção de estados excitados singletes (S1, S2, S3), havendo uma transferência de energia rápida, sem emissão de luz, ao estado singlete excitado de mais baixa energia, isto é, uma relaxação vibracional para o nível vibracional mais baixo do estado eletrônico final.⁴⁹

A partir do estado singlete, o FS pode emitir fótons retornando ao estado fundamental, processo chamado de fluorescência. Deve ser enfatizado que, apesar de algumas exceções, a emissão de fluorescência ocorre a partir de S1 e suas características (exceto polarização) não dependem do comprimento de onda de excitação (considerando que somente exista uma espécie no estado fundamental). O máximo de emissão de fluorescência é localizado em comprimentos de onda maiores (energia mais baixa) que o máximo de absorção, por causa da perda de energia no estado excitado devido à relaxação vibracional (chamado de deslocamento Stokes).^{50,51}

Existe o cruzamento intersistemas no qual parte da energia absorvida é liberada, sem emissão de luz, de modo que o FS atinge o estado triplete.^{50–52}

A partir do estado triplete, cujo tempo de vida é maior em comparação ao estado singlete, o FS pode perder energia por processos não radiativos, radiativos (fosforescência) ou participar da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS- do inglês- *Reactive Oxygen Species*) por 2 mecanismos distintos: transferência de elétrons, formando radicais livres, conhecida por reação do tipo I; ou transferência de energia ao oxigênio molecular gerando o

oxigênio singlete- reação tipo II. A ocorrência das reações tipo I ou tipo II depende de diversos fatores, incluindo características físico- químicas do FS e o microambiente em que o FS está inserido que afeta seu estado de agregação, a quantidade de oxigênio e outros substratos presentes.⁴³

Inicialmente, o uso da PDT foi limitado para aplicações em lesões neoplásicas e não neoplásicas e, tem demonstrado ser uma alternativa no tratamento de infecções microbianas locais. A PDT tem como vantagem a diminuição do uso de antimicrobianos, preservando assim a utilização destes para infecções generalizadas ou septicemia, além de reduzir o aparecimento de novas cepas de microrganismos resistentes.⁵³

aPDT tem sido proposto como uma abordagem alternativa para a inativação de microrganismos. O efeito terapêutico da aPDT está relacionado a várias propriedades físicas, químicas e biológicas específicas do FS. Um FS ideal deve ser quimicamente puro, possuir alta estabilidade foto e térmica, acumular-se seletivamente no tecido-alvo, ter um curto intervalo de tempo entre a administração e o acúmulo máximo no tecido, e ser rapidamente eliminado do corpo após o tratamento. Além disso, a absorção máxima do FS deve corresponder à janela óptica (600-800nm) e ter um alto coeficiente de extinção molar. Nesta faixa óptica, a penetração da luz no tecido mole é bastante alta e a energia do estado tripleto é suficiente para produzir oxigênio singlete.^{8,54}

Além disso, o FS deve ter toxicidade escura mínima e ser citotóxico apenas na presença de luz em um comprimento de onda definido. Também é importante que o FS administrado ao paciente tenha natureza anfifílica. Isso garante que o transporte no sistema circulatório ocorra sem agregação e com penetração efetiva através da camada lipídica da membrana celular.⁵⁵⁻⁵⁷

Os FS usados na aPDT são distribuídos em vários compartimentos intracelulares havendo dano localizado nos sítios de geração de oxigênio singlete, mas também produzem radicais que podem migrar para longe do local de formação.^{58,59} Os FS difundem-se nos lipídios da membrana plasmática, induzindo a danos em cada local pois pode atingir a membrana e / ou atravessá-la e atingir alvos intracelulares.⁵⁹

Huang *et al*, relataram que FS neutros, aniônicos e catiônicos efetivamente destroem bactérias Gram-positivas, mas apenas os catiônicos

podem fotoinativar bactérias Gram-negativas. No caso de FS catiônicos, a carga positiva permite que haja ligação à membrana celular bacteriana carregada negativamente e, em alguns casos, penetre nas células microbianas devido à natureza porosa da parede celular.⁶⁰ Dentre os FS catiônicos, os corantes fenotiazínicos tem apresentado potencial para aplicação na aPDT.

1.3.1 Corantes fenotiazínicos

Fotossensibilizantes fenotiazínicos são compostos que apresentam estrutura molecular composta por um esqueleto tricíclico com grupos laterais auxocrômicos, carregam uma única carga positiva (Figura 6) e exibem alto rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi \approx 0,5$).^{61,62}

Os compostos fenotiazínicos são comercializados na forma de sais sendo que o cromóforo é catiônico, o que facilita a sua interação com bactérias. Os FS catiônicos se ligam às bactérias devido a interações eletrostáticas, uma vez que existe um potencial negativo na superfície celular.⁶³

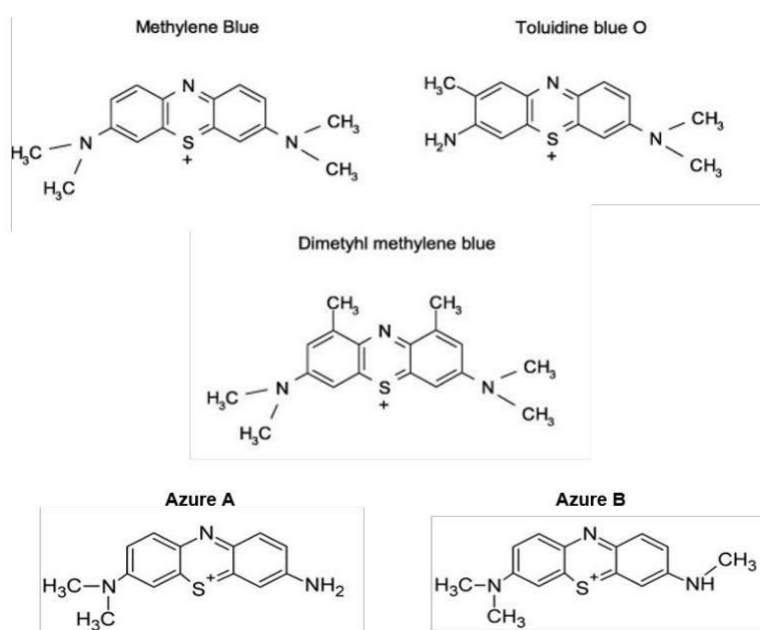


Figura 6. Estrutura molecular de alguns corantes fenotiazínicos. Azul de metileno, Azul de O-Toluidina, Dimetil azul de metileno, Azure A , Azure B. ^{64,65}

Bactérias possuem superfície celular com carga negativa que atua como um eletro-atrativo para FS catiônicos, sendo este bem vinculado e absorvido por

bactérias. Sob condições fisiológicas, 1,9 dimetil azul de metileno (DMAM) tende a existir de forma catiônica e essa natureza carregada positivamente favoreceria o direcionamento e a ligação da membrana, enquanto sua anfifilicidade estrutural favorece o particionamento e o acúmulo da membrana.^{58,59,73} O DMAM liga-se fortemente ao ácido teicóico da parede celular bacteriana.

Em química orgânica o coeficiente de partição (Log P) ou coeficiente de distribuição é a razão entre a concentração de um composto nas duas fases de uma mistura imissível (composto orgânico/água) no equilíbrio, portanto, esses coeficientes são a medida da diferença de solubilidade de um composto em dois solventes (hidrofóbico/hidrofílico). Logo, o coeficiente de partição mede o grau de lipofilicidade ou hidrofiliicidade de um soluto. As diferenças na eficácia da PDT podem estar relacionadas às propriedades dos FS. Uma delas é a característica de lipo, hidro ou anfifilicidade, determinada por meio do coeficiente de partição.⁶⁹

Quanto maior o coeficiente de partição P, há maior permeabilidade e acúmulo de moléculas do FS em regiões hidrofóbicas da membrana celular. É necessário portanto, o conhecimento do comportamento dos FS em diferentes substratos pois, este comportamento, está intimamente ligado com o coeficiente de partição. Este conhecimento deve estar centrado principalmente em solução aquosa e nos diversos lipídios presentes em meios biológicos.⁶⁹

Os corantes AM, Azure A (AA) e Azure B (AB) são hidrofílicos (log P<1). Em sistemas biológicos, o AM é reduzido a leuco-AM pelas coenzimas NADH e FADH, portanto sujeito à redução metabólica. Sabe-se que os FS podem ser reduzidos à forma leuco por enzimas mitocondriais. A forma incolor de leuco forma não é fotoquimicamente ativa e pode afetar a fototoxicidade total. Entretanto, em concentrações mais altas, o AM pode se localizar nas mitocôndrias e o efeito da PDT pode ser alcançado através de danos lisossômicos.^{62,66}

Os derivados do AM como DMAM e 1-metil azul de metileno são lipofílicos. Além disso, os metilados têm ação tóxica sobre as células na ausência de luz. Uma maior dosimetria, em função do aumento da taxa de fluência, potencializa a fototoxicidade do AM, mas possui pouco efeito nos seus derivados metilados. Os derivados metilados apresentam-se nas suas formas oxidadas

(catiônicas) por tempo maior que o AM e, conseqüentemente, têm altas concentrações de formas fotoativas.^{67–69}

Apesar dos FS fenotiazínicos possuírem similar estrutura, eles têm apresentado comportamentos distintos quanto à citotoxicidade. Francisco *et al.*⁷⁰ avaliaram em seu estudo a eficácia fotodinâmica dos FS AM, AA e AB (1,1, 6,3, 1,8 mmol, respectivamente) em células tumorais (IC₅₀) no escuro e sob irradiação (tempo de irradiação de 40 minutos com uma irradiância de 2,9 mW cm², exposição radiante de 7 J cm²). Os dados de citotoxicidade e fototoxicidade demonstraram que o aumento nas concentrações de FS foi diretamente relacionado à redução no número de células viáveis. AB foi o mais citotóxico em ambos ensaios (escuro e irradiação). A fototoxicidade de AM e AB foi semelhante, enquanto o AA mostrou ser menos fototóxico.

Além da variação da eficácia entre as moléculas, a eficiência fotodinâmica também varia entre diferentes microrganismos.⁷² A aPDT tem demonstrado ser mais eficaz na inativação de espécies Gram-positivas em comparação com Gram-negativas. A susceptibilidade diferencial surge devido a diferenças estruturais da parede celular desses dois grupos.^{84,86} A parede celular das bactérias Gram positivas possui poros de peptideoglicanos e ácidos lipoteicóicos que possibilitam a passagem dos FS, dando assim amplo acesso à membrana citoplasmática. Por outro lado, no caso das Gram negativas, a membrana externa funciona como uma barreira adicional, evitando ou dificultando a entrada de FS, preservando a parede celular, o espaço interplasmático e a membrana citoplasmática.⁸⁴

Agregação ou Metacromaticidade

Metacromaticidade é a mudança da absorção máxima do corante para menores comprimentos de onda (*“blue shift”*). Em situações como aumento da concentração, presença de polímeros aniônicos ou sais inorgânicos, seus espectros de absorção mudam devido a interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre as moléculas de corante e as moléculas adjacentes. Esta interação resulta na agregação do corante que, em alguns casos, fica restrita à dimerização.^{71,72}

A adição de fenotiazínicos a uma suspensão contendo bactérias, leva a agregação do corante através da formação de dímeros ligados a biopolímeros

presentes na superfície bacteriana.^{71,72}

A dimerização pode ser visualizada por espectrofotometria, verificando o efeito metacromático que ocorre devido à interação de corantes como AM e AT com LPS. Desta forma, há um declínio do pico de absorção máxima com aumento do pico de absorção característico de dímeros em menores comprimentos de onda (Figura 7). Como a mudança nos picos de absorção ocorre em direção a menores comprimentos de onda, este efeito é conhecido como hipsocrômico. No efeito batocrômico, a mudança ocorre para maiores comprimentos de onda.⁷²⁻³

Usacheva *et al.*⁷³ reportam maior efeito metacromático para o AT do que para o AM e, de acordo com esses autores, o efeito dos dímeros pode ser mais relevante para a ação fotodinâmica do que o de espécies monoméricas, apesar, das propriedades fotofísicas e fotoquímicas das moléculas serem analisadas usualmente nas formas não agregadas. Segundo os autores, o AT não só apresentou maior efeito metacromático como também maior eficiência fotodinâmica, o que levou à hipótese da interação com LPS da membrana ser importante fator para obtenção da inativação de microrganismos.

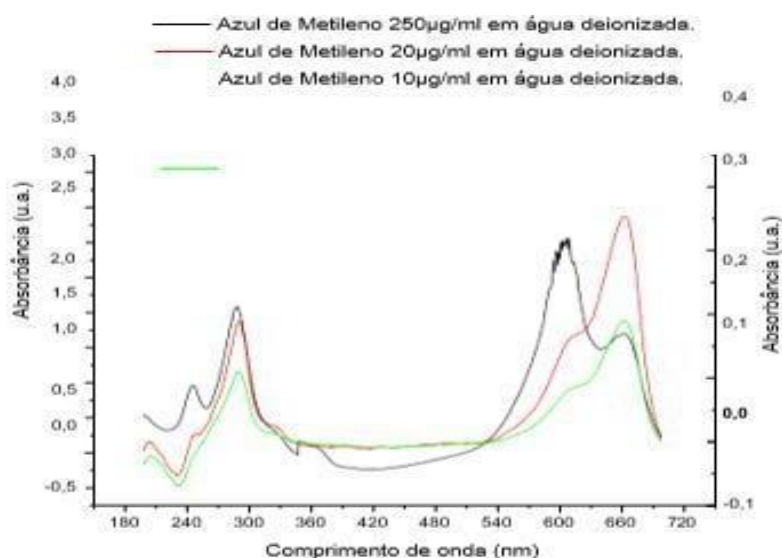


Figura 7. Espectros de absorção de solução de AM em água deionizada nas concentrações de 250 µg/mL (eixo da esquerda), 20 e 10 µg/mL (eixo direito)⁷²

Francisco *et al.*⁷¹ avaliaram as relações dímero / monômero (D / M) dos fenotiazínicos AM, AA e AB. Observaram que quanto maior a concentração avaliada, maior o valor de D / M, independentemente do FS e do meio utilizado.

Além disso, a agregação em PBS e soro fisiológico foi superior à agregação em água. Esse efeito ocorreu devido à presença de eletrólitos, uma vez que a agregação foi maior naquelas soluções com maior concentração iônica. A presença de grupos metil na periferia do cromóforo reduziu a tendência dos FS se agregarem devido efeito estérico. Portanto, AM com 4 grupos metil periféricos apresentaram a menor tendência de agregação; AB, com 3 grupos metila apresentaram agregação intermediária e AA, que possui apenas 2 grupos metil periféricos, apresentou maior tendência de agregação entre os compostos estudados.

Nunez⁷² discute em seu estudo, que vários fatores interferem na eficiência da terapia fotodinâmica, os resultados obtidos em relação à morte de microrganismos não foram completamente homogêneos. Usualmente, a eficiência dos FS (rendimento quântico para estado tripleto, tempo de vida dos estados excitados, potencial redox) é avaliada com base nas propriedades fotofísicas e fotoquímicas de suas espécies monoméricas. A participação de dímeros de AM em processo fotodinâmico foi recentemente demonstrada contra várias espécies microbianas. Nos casos em que lasers são empregados para a ativação do corante, o comprimento de onda de seleção para ativação do corante é sempre o da banda correspondente a espécies monoméricas, independente da concentração empregada, do tipo de solvente e do substrato utilizado. Este fato impediria a participação direta das espécies agregadas no processo fotodinâmico.

Por outro lado, alterando-se o comprimento de onda da fonte de irradiação, é possível verificar o efeito dos agregados na eficácia para a inativação microbiana. Na presença de maior quantidade de agregados, a irradiação de dímeros produz efeito igual à irradiação de monômeros o que comprova o envolvimento no processo de sensibilização.¹⁴

Collina⁷⁴, em seu estudo avaliou a ação dos corantes fenotiazínicos AA, AB e DMAM em diferentes meios (água, tampão fosfato salino - PBS, solução fisiológica - 0,90% NaCl, uréia 1,00 mol / L e dodecil de sódio sulfato 0,25% - SDS, a 20,00 mg / L para AA e AB e a 0,50 mg / L para DMAM) que modulam a agregação. A cultura planctônica de *C. albicans* foi tratada com FS em diferentes concentrações (0-100,00 mg / L), tanto no escuro (5 min) quanto irradiado (640

± 12 nm LED durante 30 min, $2,60 \text{ mW} / \text{cm}^2$). A razão de captação celular e o dímero com os monômeros foram determinadas por espectrofotometria. A razão dímero para monômero (D / M) foi um parâmetro simples para avaliar o estado de agregação dos FS e foi determinado pela razão entre a absorbância no comprimento de onda da absorção máxima do dímero e monômero de cada FS. Todos os FS mostraram uma relação entre o meio e a agregação. A agregação de AM foi menos influenciada pelo meio, uma vez que os valores D / M variou de 0,29 no SDS a 0,48 na solução fisiológica. AA e AB apresentou comportamento semelhante, apresentando valores D / M de 0,6 no SDS a 1,1 na solução fisiológica e 0,5 em SDS a 1,0 na solução fisiológica, respectivamente. DMAM teve a agregação principalmente influenciada pelo meio, apresentando um valor D / M tão baixo (0,29) em SDS e tão alto (2,3) na solução fisiológica. Para todos os compostos estudados, os menores valores D / M ocorreram no SDS, e o mais alta na solução fisiológica.

Conforme descrito anteriormente, o oxigênio singlete, é considerado de fundamental importância no processo de fotossensibilização.^{11,50} A fotoquímica de monômeros de AM apresenta predominância para formação de oxigênio singlete; já os dímeros apresentam maior rendimento para reações do tipo I, envolvendo transferências eletrônicas importantes para o processo fotodinâmico.⁷⁰

1.3.2 Fontes de Irradiação

Uma vez que, o comprimento de onda de absorção máxima para os compostos fenotiazínicos, se altera devido à presença de agregados, as fontes de irradiação podem apresentar papel fundamental no processo fotodinâmico.^{43,62}

No estudo de Francisco *et al.*⁶⁶ o LED vermelho foi utilizado nos comprimentos de onda entre 629 e 649 nm, permitindo seu uso com os FS AM,⁷⁵ AA e AB que têm absorção dentro desta faixa. Os monômeros AM apresentaram máxima de absorção a 664 nm, AA a 630 nm e AB a 644 nm, em solução aquosa, verificando que a gama de comprimentos de onda cobertos pelo LED foi suficiente para excitar os FS utilizados.

Chan e Lai⁷⁶ reportaram o efeito de diferentes comprimentos de onda ($\lambda = 632,8\text{nm}$, $\lambda = 665\text{nm}$ e $\lambda = 830\text{nm}$) utilizando fontes laser para erradicação de patógenos periodontais utilizando AM. Nesse estudo, os melhores resultados foram para um laser com $\lambda = 665\text{nm}$, o que seria de se esperar uma vez que este comprimento de onda corresponde ao comprimento de onda de absorção máxima do AM. O fato do laser em $\lambda = 830\text{nm}$ ter produzido algum efeito pode estar relacionado à presença de bactérias que possuem pigmentos negros, como a *Prevotella intermedia* e a *Porphyromonas gingivalis*, uma vez que o AM não absorve luz neste comprimento de onda, não causando efeito fotoquímico.

Além do espectro de emissão da fonte de irradiação os parâmetros de irradiação utilizados variam largamente entre os estudos. Wainwright *et al.*⁹ utilizaram caixa de luz Exal com uma saída de comprimento de onda de $350 \wedge 800\text{nm}$ e $1,7\text{ mW/cm}$ por uma hora para excitação de compostos fenotiazínicos (AM, DMAM e novo AM), a fluência foi mensurada por Medidor de luz Skye SKP 200 (Skye Instruments Ltd). Souza *et al.*⁷⁵ utilizaram laser de 30mW , com comprimento de onda de $\lambda = 685\text{nm}$, para ativação de AM durante 5 minutos. Em ambos estudos, uma resposta satisfatória foi reportada.

1.4. aPDT e FS fenotiazínicos: Estado da Arte

O AM tem conhecida ação antimicrobiana desde a Segunda Guerra Mundial, sendo associado à PDT em vários estudos.^{69,77,78} Para a aplicação clínica da aPDT, os compostos fenotiazínicos, mais especificamente o AM e o AT, têm se apresentado como bons agentes fotossensibilizantes. Características como seus comprimentos de onda de absorção máxima ($\lambda = 660\text{nm}$ e $\lambda = 630\text{nm}$, respectivamente), sua disponibilidade e baixo custo, e sua baixa toxicidade, uma vez que, estes compostos são utilizados na área médica para uma série de finalidades terapêuticas em concentrações muito superiores às aquelas utilizadas em PDT, fazem desses compostos propostas bastante interessantes.^{78,79}

Wainwright *et al.* demonstraram o efeito da aPDT com os corantes fenotiazínicos AM, DMAM, AB, AT e novo azul de metileno (nAM) em cepas patogênicas de *S. aureus*, sendo quatro resistentes à meticilina. A aplicação do tratamento fotodinâmico foi realizada a uma irradiância de $1,75\text{ mW/cm}^2$, exposição radiante de $6,3\text{ J/cm}^2$, 60 min de irradiação, utilizando o equipamento

Skye SKP 200 light meter (Skye Instruments[®] Ltd) de comprimento de onda 350-800nm. Relataram como resultado elevada atividade antibacteriana em suspensão e em maior eficácia do que a flucloxacilina análoga à meticilina. Para o AM, o DMAM e o nAM, a atividade bactericida foi 4 vezes maior. Além disso, o DMAM e o nAM foram ativos contra cepas epidêmicas de *S. aureus* resistentes à meticilina em concentrações menores que a da vancomicina.⁹

O uso da aPDT no estudo de Pereira *et al.*¹⁸ teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a internalização do AM e sua atividade fotodinâmica frente a uma cepa clínica e ATCC de *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus*. As cepas foram incubadas com AM nas concentrações de 100, 300 e 500 µg / ml e irradiadas com LED (\pm 660 nm) na fluência de 10 e 25 J / cm². A internalização AM foi avaliada usando um microscópio confocal (Zeiss LSM 700), para capturar o AM e o DAPI (para coloração de DNA). Foi possível observar que o AM foi internalizado pelas células bacterianas, em todas as concentrações testadas. A contagem de CFU / ml demonstrou significativa redução ($p \leq 0,01$) na média de 5,0 logs em comparação com o grupo controle para as duas espécies em todas as concentrações. Em conclusão, as cepas testadas foram capazes de internalizar o AM. aPDT com AM foi capaz de diminuir o crescimento das cepas testadas *in vitro*.

O estudo de Monteiro *et al.*⁷³ testou a eficácia antimicrobiana da aPDT associada ao uso de composto fenotiazínico em cultura planctônica de *S. aureus*. O composto de corantes AM e AT foi utilizado na proporção 1:1 e nas concentrações 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/ mL. A fonte de luz foi Laser (660nm), irradiada por 5 minutos para cada exposição radiante (2,4; 4,8; 7,2; 9,6 e 12 J/cm²). O resultado deste experimento foi de inibição $\geq 99,9\%$ de crescimento da bactéria *S. aureus* quando houve a associação das fenotiazinas a 50 e 100 µg/mL e fluência de 12 J/cm². Os autores concluíram que a aPDT atinge maior eficácia quando da combinação de concentrações de FS fenotiazínicos e exposição radiante específicos.

A ação do AM em biofilmes de *S. aureus* e *Escherichia coli* cultivados em amostras de resina acrílica e submetidos à terapia fotodinâmica usando laser de diodo de 660 nm, exposição radiante de 20J/cm² e concentrações variando de

37,5 a 3000 μM . Os melhores resultados foram obtidos com concentrações de aproximadamente 300 μM de AM, com reduções microbianas de 0,8-1,0 \log_{10} .⁸⁰

Briggs *et al.*⁸¹ investigou a eficácia da concentração de AM na inibição do crescimento de *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA), *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. aPDT foi aplicada em cultura planctônica e após a formação de biofilme em discos de titânio polido e hidroxiapatita. Os resultados mostraram que os estafilococos foram erradicados na menor concentração de AM 0,1 mM. Em *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, o aumento da concentração de AM aumentou o efeito bactericida. Os resultados mostraram também que na potência de laser $\geq 35 \text{ J} / \text{cm}^2$ e uma exposição radiante de $35 \text{ mW} / \text{cm}^2$, houve erradicação de *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* cultivada em um biofilme mostrou-se menos sensível a aPDT quando comparada a estafilococos, e uma superfície revestida com hidroxiapatita reduziu a eficácia da aPDT bacteriana nestes ensaios experimentais.

O estudo de Kashef *et al.*⁵⁴ avaliou a eficácia do PDT com AM e AT na erradicação de biofilmes de *S. aureus* em combinação com o antibiótico linezolid. No experimento, a concentração de corante utilizada foi de 5, 50 e 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para o corante AM, foi utilizado Laser de diodo de 35 mW (Lasotronic®-Switzerland) com comprimento de onda de 660 nm e taxa de fluência $91 \text{ mW} / \text{cm}^2$, e para amostras incubadas com o corante AT, foi utilizado um laser de diodo de 10 mW (MUSTANG®- Russia), com comprimento de onda de 630 nm e taxa de fluência de $26 \text{ mW} / \text{cm}^2$. Os biofilmes foram irradiados por 10 min e submetidos exposição radiante: $54.6 \text{ J}/\text{cm}^2$ para AM e $15.6 \text{ J}/\text{cm}^2$, para AT. A atividade bactericida (redução de $\geq 3 \log_{10}$ na contagem de células viáveis) não foi alcançada com AM / AT com PDT ou tratamento antibiótico sozinho. Quando o tratamento antibiótico foi combinado com AT e PDT, uma maior redução na contagem viável foi observada.

O efeito da terapia fotodinâmica em *S. aureus* e *Candida albicans* em biofilme *in vitro* foi estudada por TUNCCAN⁸², com os FS rosa bengala, AM e riboflavina sob LED e UVA. A combinação mais eficaz foi LED vermelho (5minutos; 0,77 mW; 233 mJ/cm²; 300 mW) + AM (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) contra os estafilococos e biofilmes candidais.

No estudo de Gualdesi⁵⁷, AB e o Azure B monoiodado foram avaliados contra *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA) e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) nas concentrações de 5 µM e 15 µM, respectivamente. Em seguida, as suspensões de AB e ABI foram irradiadas a 8,4 mW / cm² por 30 e 15 min, com uma dose total de 15,1 J/cm² e 7,6 J/cm², respectivamente. As amostras foram irradiadas a uma distância de 5 cm com uma lâmpada Parathom[®] (OSRAM 5-W). Azure B monoiodado mostrou melhores propriedades químicas e fotoquímicas em comparação com AB e exibiu boa atividade antibacteriana contra MSSA e MRSA.

Pinheiro *et al*⁸³, avaliaram a eficácia do DMAM associado ao uso de laser (660 nm), LED (632 ± 2 nm) ou uma luz polarizada multiespectral (400 - 2000 nm) usando diferentes densidades de energia em *E. faecalis* (Laser e LED) e em *S. aureus* (luz polarizada) *in vitro*. Para isso, foram utilizados 300 ng/mL de DMAM para os ensaios com *S. aureus*, e 3,32 ng / ml para os ensaios com *E. faecalis*. As densidades de energia aplicadas foram de 5 J / cm² em luz polarizada e de 18 J / cm² para Laser / LED. Foram utilizados cinco minutos de tempo de pré-incubação. Os resultados mostraram uma redução de 99,97% na contagem de UFC de *S. aureus* e de 99,99999998% de *E. faecalis* (usando as duas fontes de luz). Este estudo concluiu que aPDT realizada com DMAM associado a laser, LED ou luz polarizada foi eficaz na redução, *in vitro*, da contagem de aeróbios e bactérias gram-positivas anaeróbias e aerotolerantes.

Sampaio *et al*⁵⁹, avaliaram a eficácia antimicrobiana do uso de 3,32 ng / mL de 1,9-dimetilmetileno azul (DMAM) como FS associado ao uso de Laser (λ660 nm) ou LED (λ632 ± 2 nm) usando diferentes densidades de energia (6, 12 e 18 J / cm²) em *E. faecalis in vitro*. Em diferentes condições experimentais, 14 grupos de estudo, em triplicata, foram usados para comparar a eficácia do aPDT realizado tanto com laser e LED usando diferentes densidades de energia associadas ao DMAM. O método do número mais provável (MPN) foi usado para a análise quantitativa. A eficácia antimicrobiana fotodinâmica foi diretamente proporcional à densidade de energia utilizada, chegando a 18 J / cm², Redução de 99,999998% das contagens de *E. faecalis* usando ambas as fontes de luz. Os ensaios experimentais deste estudo mostraram que o uso de 3,32 ng / mL de DMAM associado ao uso de 18 J / cm² de luz LED (λ632 ± 2

nm) reduziu >7 log na contagem em cultura planctônica de *E. faecalis*. Os resultados deste estudo mostraram que a concentração de 3,32 ng / mL de DMAM era segura e 500 vezes abaixo da concentração estabelecida como tóxica. Isso é clinicamente relevante, pois, idealmente, o fotossensibilizador utilizado em aPDT deve ser eficaz na menor concentração possível, além de potencializar seus efeitos por irradiação de luz. Os autores concluíram que o uso exclusivo de uma fonte de luz com diferentes densidades de energia não foi capaz de afetar significativamente a morte de bactérias. No entanto, foi demonstrado que é possível reduzir a contagem bacteriana por irradiação da luz devido à foto-erradicação ou por foto-bioinibição.

Monteiro *et al*⁷², avaliaram os efeitos de inativação fotodinâmica de DMAM em nanoconcentrações (0, 25, 100, 200, 400, 600, 800 and 1000 ng/mL). e associado a AuNPs (nanopartículas de Ouro) com LED vermelho (λ 630 nm \pm 20 nm, 125 mW, 12 J / cm², 192 s) em ensaios in vitro de suspensão de *S. aureus*. De acordo com os resultados, a inativação fotodinâmica de *S. aureus* nos grupos DMAM+ LED e DMAM-AuNPs + LED, mostraram similar redução significativa da carga microbiana, (p <0,0001) quando comparado ao grupo Controle. A redução decimal (RD) de esses grupos eram 99,96% e 99,994%, respectivamente. A conclusão deste trabalho relatou que a inativação fotodinâmica foi pouco aumentada usando DMMB-AuNPs em *S. aureus*. A ação do fotossensibilizador utilizado isoladamente não apresentou redução significativa na população de *S. aureus* quando comparado ao grupo controle, pois a concentração usada neste estudo (300 ng / mL) estava abaixo da IC 50 (340,5 ng / mL).

Estudos avaliando a ação dos FS AA, AB e DMAM em comparação ao AM, além de estabelecer a relação entre a eficácia e a agregação dos compostos (metacromaticidade), podem sugerir novas estratégias para aumentar a eficácia da aPDT.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Comparar a eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana com diferentes concentrações de fenotiazínicos (AA, AB, DMAM e AM) na redução do crescimento *in vitro* de *S. aureus*.

2.2. Objetivos Específicos

- Comparar a toxicidade no escuro dos corantes fenotiazínicos AA, AB, DMAM e AM no crescimento *in vitro* em suspensão de *S. aureus*.
- Comparar a ação da aPDT com AA, AB, DMAM e AM no crescimento *in vitro* em suspensão de *S. aureus*.
- Determinar a incorporação dos corantes fenotiazínicos AA, AB, DMAM e AM em suspensão de *S. aureus*.

3. METODOLOGIA

A avaliação da eficácia da aPDT foi realizada a partir de ensaios *in vitro* em *S. aureus*, nos quais foram testados os agentes FS AA, AB, DMAM e AM.^{8,84-}

86

3.1. Preparo de soluções

3.1.1. Meios de cultura

Para preparo do meio caldo BHI (do inglês, *Brain Heart Infusion*) 1% Sacarose, conforme instruções do fabricante, foram adicionados 37g de BHI (K25-1400, KASVI®) para 1 Litro de água milli-Q. Em seguida, 0,37g de sacarose foi acrescido à solução. O caldo foi esterilizado em autoclave e armazenada sob refrigeração (6- 10° C) até o momento de uso.

Para preparo do meio ágar BHI 1% Sacarose, para 1 Litro de água milli-Q foram adicionados 52g de BHI (K25-1400, KASVI®), conforme instruções do fabricante. Em seguida, 0,52 g de sacarose foi acrescido à solução. A solução foi esterilizada em autoclave e dispensada em placas de petri estéreis e sob fluxo laminar. Após geleificação do meio, as placas foram acondicionadas em filme pvc e armazenadas sob refrigeração (6- 10° C) até o momento de uso.

3.1.2. Outras soluções

Para o preparo da solução tampão fosfato salino (PBS) foram utilizados: NaCl (Cloreto de Sódio) 137 mM, KCl (Cloreto de Potássio) 2,7 mM, Na₂HPO₄ (Fosfato de Sódio) 4,3 mM, água milli-Q estéril e ajustado o pH 7,4.

Soluções-estoque dos agentes FS (AA, AB, DMAM e AM) foram preparadas na concentração de 1 mg/mL. Para isso, foram pesados 10,0 mg de FS que foram diluídos, em capela de fluxo laminar, em 10,0 mL de água milli-Q estéril. As soluções- estoque foram preparadas em fluxo laminar e armazenadas em tubos esterilizados, sob temperatura ambiente e protegidos da exposição à luz.

A partir da diluição das soluções estoque dos agentes FS (AA, AB, DMAM e AM) em água milli-Q estéril foram preparadas soluções em concentrações menores (20, 40, 100 e 200 mg/L). Para o FS DMAM também foram preparadas

soluções nas concentrações 2, 4 e 10 mg/L. As soluções diluídas foram preparadas em fluxo laminar e armazenadas em tubos esterilizados, sob temperatura ambiente e protegidos da exposição à luz.

3.2 Ensaios Biológicos

Cepa padrão de *S. aureus* NEWP 0023 (lote 6550, microrganismo viável padrão estabilizado, NEWPROV) foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Biociências desta Instituição de Ensino.

Para a padronização do inóculo de *S. aureus* utilizado neste estudo, a viabilidade celular e potencial de crescimento em caldo de cultura BHI foi verificada; assim como as características específicas de formação de colônias e morfologia da espécie foram comprovadas por cultura em meio ágar BHI acrescido de sacarose a 1%, coloração de Gram e microscopia.

As bactérias foram colhidas em caldo BHI, ajustando a turbidez da suspensão por escala 0,5 de *Mac Farland*. As bactérias foram diluídas em 3×10^8 unidades formadoras de colônias por mL (UFC/ mL) em caldo BHI e essa suspensão foi usada como inóculo nos ensaios deste estudo. A padronização deste inóculo foi obtida a partir da relação da curva padrão entre a turbidez escala 0,5 de *Mac Farland* e o número de células bacterianas (3×10^8 UFC/mL). O inóculo padronizado foi armazenado em tubos eppendorf FS e mantidos sob refrigeração a -80°C .

3.2.1 Ensaios Biológicos em suspensão

3.2.1.1 Avaliação da toxicidade dos FS fenotiazínicos (AM, AA, AB e DMAM) no escuro

Para esta etapa de ensaios em suspensão, realizou-se a ativação microbiana a partir do descongelamento do inóculo padrão por 90 minutos em estufa a 37°C . A alíquota de 500 μL do inóculo padrão foi diluída em 10mL água milli-Q estéril, seguida da armazenagem em estufa a 37°C durante 60 minutos para padronizar a viabilidade bacteriana na solução (Figura 8).

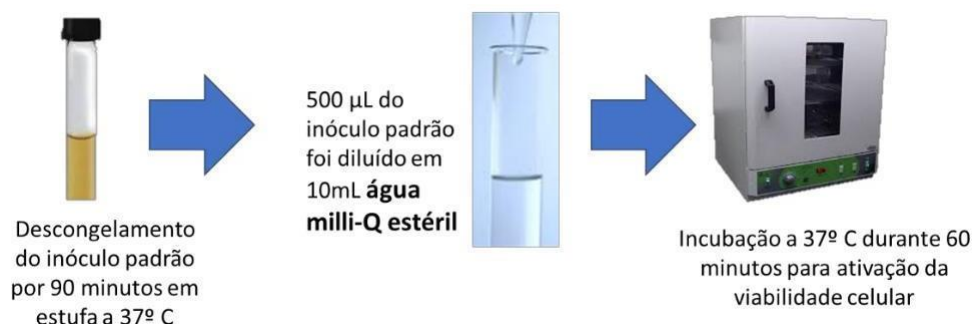


Figura 8: Representação esquemática da ativação microbiana do inóculo padrão (3×10^8 UFC *S. aureus* /mL) em veículo água milli-Q.

Nesta etapa do estudo, foram utilizadas microplacas de poliestireno de 48 poços de fundo chato com tampa (Sarstedt[®]) e os ensaios realizados em fluxo laminar. A cada poço foram adicionados 200 µL de inóculo bacteriano ajustado e 200 µL de solução diluída dos FS AA, AB e AM nas concentrações finais 20, 40, 100 e 200 mg/L, e 2,4,10 e 20 mg/L de DMAM. Como controle foi utilizada água milli-Q estéril. As microplacas foram incubadas a 37° C no escuro por 5 minutos, e depois aguardaram o período de 7 minutos em temperatura ambiente e no escuro.

Após esse período, uma alíquota de 20 µL de cada poço foi submetido a diluição seriada (10^{-1} a 10^{-5}) em 180 µL água milli-Q estéril, utilizando microplacas de poliestireno de 96 poços (Sarstedt[®]). O volume de 20 µL de cada amostra diluída foi semeado em ágar BHI 1% sacarose. As placas foram

incubadas a 37 °C, por 24 horas.

8,45,87–89

Após período de incubação das

amostras, a contagem de UFC foi obtida por quatro examinadores e os resultados registrados em planilhas no Microsoft Office Excel (Microsoft Windows[®]). Os ensaios ocorreram em triplicata para todas as amostras (Figura 9).

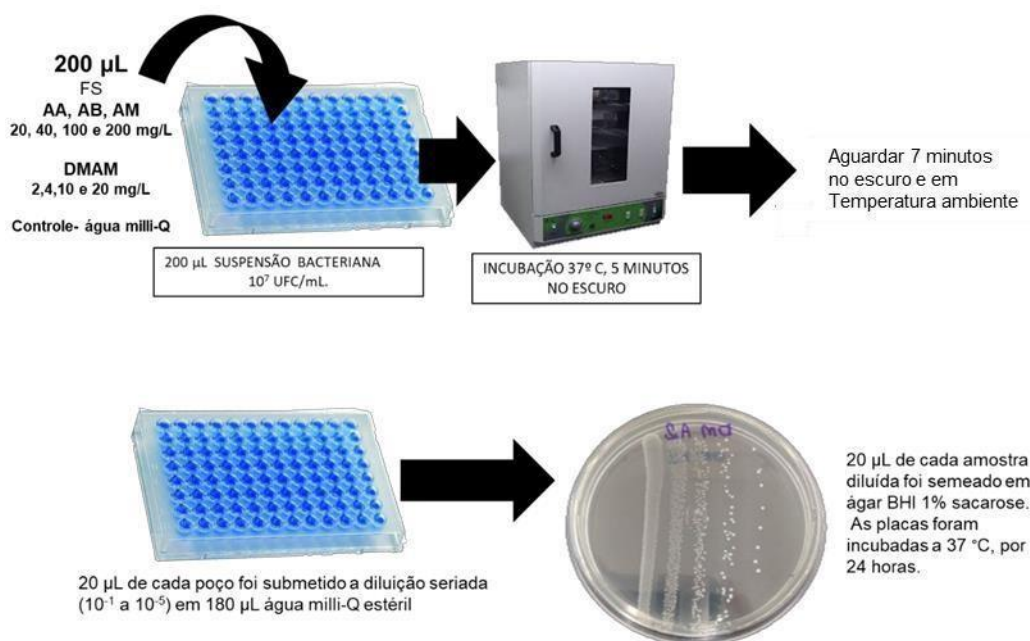


Figura 9: Inóculo bacteriano foi testado com os FS AA, AB e AM (20, 40, 100 e 200 mg/L), e DMAM (2,4,10 e 20 mg/L). Como controle foi utilizada água milli-Q estéril. As microplacas foram incubadas a 37° C no escuro por 5 minutos, e depois aguardaram o período de 7 minutos em temperatura ambiente e no escuro. Diluição seriada (10⁻¹ a 10⁻⁵) de cada amostra foi realizada, seguida da Semeadura em placas de meio BHI 1% sacarose.

3.2.1.2 Avaliação da aPDT com FS fenotiazínicos (AM, AA, AB e DMAM) em *Staphylococcus aureus*

A resposta da aPDT utilizando variadas concentrações de FS fenotiazínicos (AM, AA, AB e DMAM) em *S. aureus* foi avaliada em ensaios em suspensão. A ativação microbiana ocorreu a partir do descongelamento do inóculo padrão por 90 minutos em estufa a 37° C como demonstrado na Figura 8, a alíquota de 500 µL do inóculo padrão foi diluída em 10mL água milli-Q estéril, seguida da armazenagem em estufa a 37° C durante 60 minutos para padronizar a viabilidade bacteriana na solução.

Microplacas de poliestireno de 48 poços de fundo chato com tampa (Sarstedt®) foram utilizadas e os ensaios realizados em fluxo laminar. A cada poço foram adicionados 200 µL de inóculo bacteriano ajustado e 200 µL de solução diluída dos FS AA, AB e AM nas concentrações de 20, 40, 100 e 200 mg/L, e 2,4,10 e 20 mg/L de DMAM, de forma que as concentrações finais de FS eram metade daquelas adicionadas. Como controle foi utilizado água milli-Q

estéril. As microplacas foram incubadas a 37^o C no escuro por 5 minutos. O tratamento aPDT sob a irradiância de 11,2mW/cm² e à exposição radiante de 4,7 J/cm² por 7 minutos, utilizando o sistema LED 660nm (BioLambda[®], Brasil). Após esse período, uma alíquota de 20 µL de cada poço foi submetido a diluição seriada (10⁻¹ a 10⁻⁵) em 180 µL água milli-Q estéril, utilizando microplacas de poliestireno de 96 poços (Sarstedt[®]). O volume de 20 µL de cada amostra diluída foi semeado em ágar BHI 1% sacarose. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 horas (Figura 10).^{8,45,87-89}

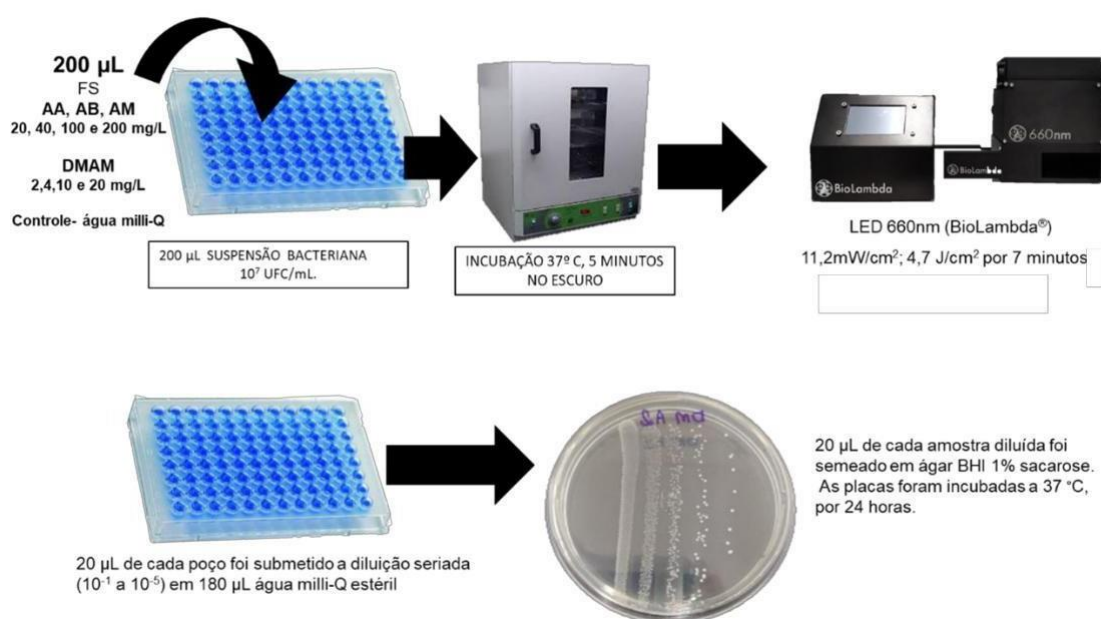


Figura 10: Representação esquemática das amostras de suspensão bacteriana nos veículo água milli-Q adicionadas aos FS AA, AB e AM nas concentrações de 20, 40, 100 e 200 mg/L, e 2,4,10 e 20 mg/L de DMAM, incubadas no escuro a 37^oC e tratamento aPDT em LED 660nm (BioLambda[®]) (11,2mW/cm²; 4,7 J/cm² por 7 minutos). Após o tratamento fotodinâmico, as amostras foram diluídas em série e semeadas em meio ágar BHI 1% sacarose.

Após período de incubação das amostras, a contagem de UFC foi obtida por quatro examinadores e os resultados registrados em planilhas no Microsoft Office Excel (Microsoft Windows[®]). Os ensaios ocorreram em triplicata para todas as amostras.

3.2.1.3 Incorporação dos Fenotiazínicos em *S. aureus*

Para esta análise, soluções dos FS AM, AA, AB e DMAM a 20mg/L foram quantificadas antes e após a incubação por 30min em estufa com 3×10^8 UFC/mL. Para que a quantificação por espectrofotometria fosse adequada, as soluções dos FS receberam SDS para atingir 0,25%, para que houvesse somente monômeros em solução. Desta forma, cada FS foi quantificado no seu λ máximo, sendo o AM em 664 nm, AA em 630 nm, AB em 645 nm e DMAM em 653 nm. Para determinação da incorporação celular, após as devidas correções das diluições, foi utilizada a fórmula:

$$\text{çã (\%)} = \frac{\text{çã} - \text{çã} \cdot 100}{\text{çã}}$$

Os testes de incorporação dos fenotiazínicos foram realizados em triplicata.

3.3. Análise Estatística

Os dados foram checados quanto a sua normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e apresentaram-se não-normais ($p < 0.05$). Foram realizadas 7 análises estatísticas: para cada corante foi realizada uma análise estatística distinta comparando as concentrações e o tipo de tratamento (PDT / escuro), totalizando 4 análises.

Os diferentes corantes em suas concentrações distintas foram comparados entre si quando submetidos a um mesmo tratamento (irradiado ou escuro), totalizando 2 análises e por fim foi realizada uma análise comparando a incorporação final dos corantes em uma única concentração.

Em todas as análises, os dados foram submetidos ao ensaio não paramétrico de Kruskal-Wallis e a comparação entre as médias foi realizada por teste de Student-Newman-Keuls, através do programa Biostat (Biostat 5.3, Instituto Mamirauá, Pará, Brasil), e considerando um nível global de significância de 95% ($\alpha = 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da toxicidade dos FS fenotiazínicos (AM, AA, AB e DMAM) no escuro

Como pode ser observado na figura 11A, há morte microbiana crescente e proporcional ao aumento da concentração do corante AA, porém ocorre redução de apenas 1,0 Log₁₀ UFC/mL, aproximadamente na maior concentração avaliada. No tratamento no escuro as concentrações de 0 e 10 mg/L apresentaram estatisticamente os maiores valores, e as concentrações de 50 e 100mg/L os menores valores, a concentração de 20 mg/L foi significativamente diferente apenas da concentração de 10 mg/L.

Por outro lado, em todas as diluições do AB foi verificado o crescimento microbiano semelhante ao Controle em todas as concentrações testadas (7,0 a 7,1 Log₁₀ UFC/mL), isto é, ausência de toxicidade no escuro (Figura 11 B).

Da mesma forma, para o AM (Figura 11C) em todas as diluições testadas não foi verificada ação antimicrobiana significativa em relação ao grupo Controle (sem FS).

Por fim, DMAM apresentou toxicidade no escuro, havendo morte microbiana crescente e proporcional ao aumento da concentração do corante, sendo necessário avaliar em uma faixa de concentração bem menor que a utilizada para os demais FS. A 10mg/L de DMAM foi observada completa erradicação microbiana (Figura 11 D). Todas as concentrações testadas apresentaram número similar de UFC, exceto a concentração de 5 mg/L que foi estatisticamente menor.

Para todos os corantes, as concentrações de 0mg/L(Controle) foram estatisticamente semelhantes entre si. Todas as concentrações avaliadas dos corantes AM e AB foram estatisticamente iguais entre si e iguais as concentrações de 0mg/L de DMAM e 0 e 10mg/L de AA, representando os maiores valores estatísticos. A concentração de 10 mg/L do corante DMAM apresentou contagem nula de UFC, sendo estatisticamente igual apenas as concentrações de 5 mg/L do corante DMAM e 100 mg/L do corante AA, os quais representam os menores valores. As concentrações de 1 mg/L do corante DMAM e de 20 e 50 mg/L de AA apresentaram resultados intermediários aos demais e semelhantes entre si (anexo tabela 5).

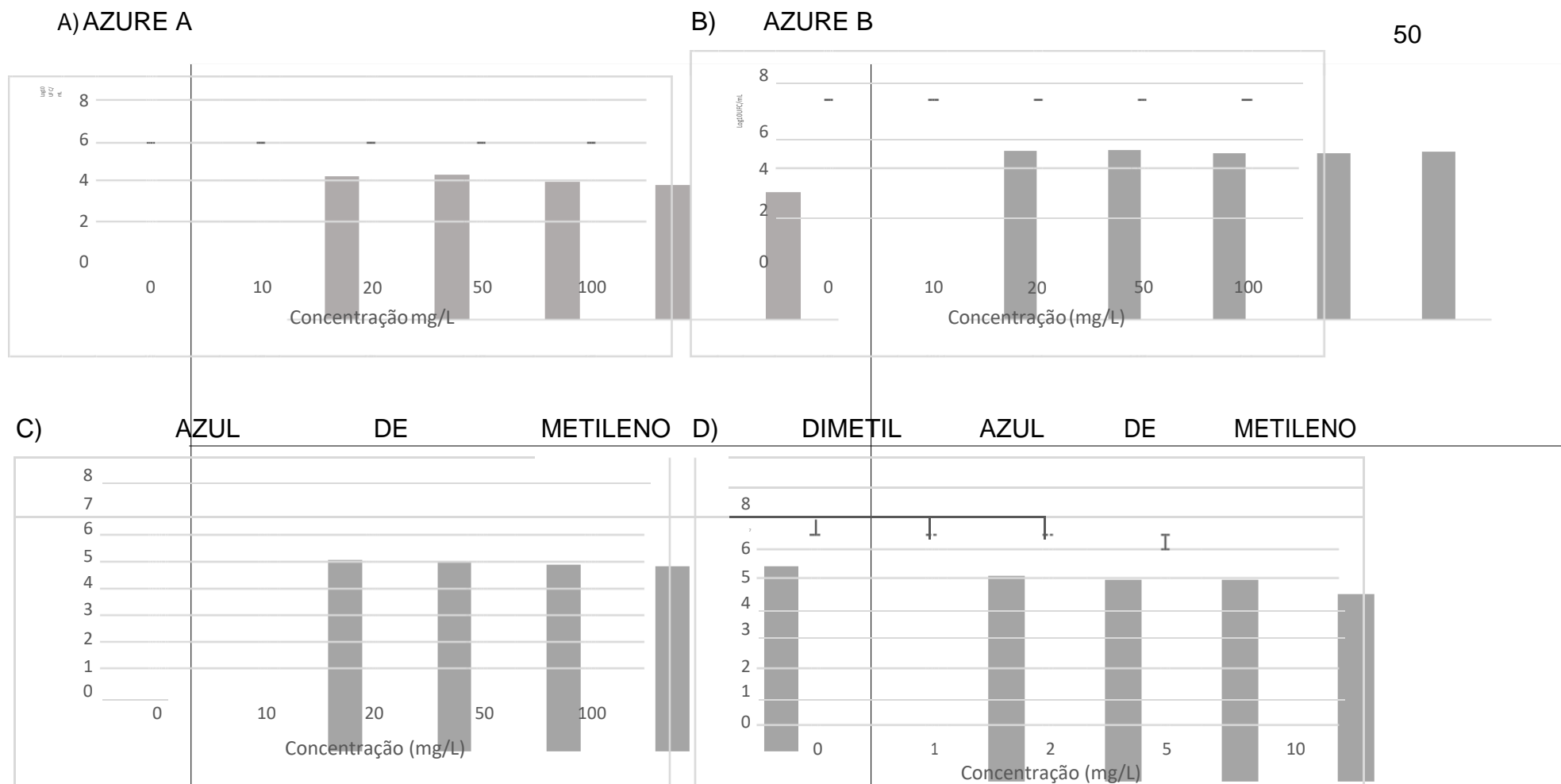


Figura 11. Avaliação da toxicidade dos FS no escuro em suspensão de *S. aureus* no veículo água milli-Q, por 30 minutos no escuro (ausência de terapia fotodinâmica), n=9. O inóculo bacteriano isento de agente FS foi considerado Controle (CT). A) AA: as concentrações de 0 e 10 mg/L apresentaram estatisticamente os maiores valores, e as concentrações de 50 e 100mg/L os menores valores, a concentração de 20 mg/L foi significativamente diferente apenas da concentração de 10 mg/L.; B) AB: todas as concentrações apresentaram número similar de UFC; C) AM: em todas as concentrações avaliadas não foi verificada ação antimicrobiana significativa em relação ao grupo Controle; D) DMAM: todas as concentrações apresentaram número similar de UFC, exceto a concentração de 5 mg/L que foi estatisticamente menor.

4.2. Avaliação da aPDT com FS fenotiazínicos (AM, AA, AB e DMAM) em *S. aureus*

A Figura 12A, mostra morte microbiana total apenas para a menor concentração testada do corante AA, não verificando relação proporcional entre a concentração de AA e redução microbiana.

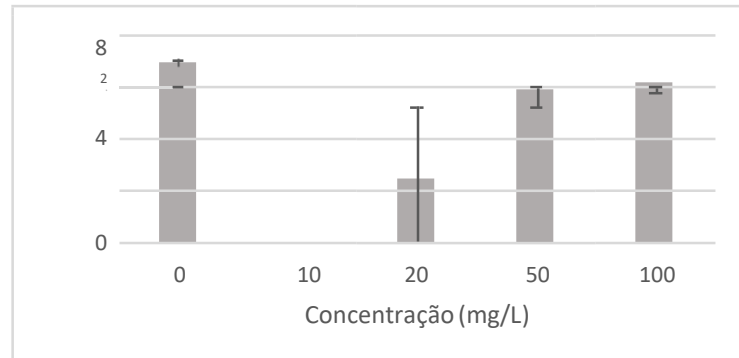
O FS AB apresentou completa inativação bacteriana em 10 e 20 mg/L (Fig.12B) enquanto causou redução de aproximadamente 1,0 Log₁₀ UFC/mL nas maiores concentrações avaliadas (50 e 100 mg/L), sendo estatisticamente semelhantes.

O AM apresentou uma relação direta entre a concentração e redução microbiana, havendo ausência de ação antimicrobiana a 10mg/L, pequena redução a 20mg/L e morte celular total nas maiores concentrações avaliadas (Fig. 12C). As concentrações de 20 a 100mg/L apresentaram menores UFC que nas concentrações de 0 e 10mg/L.

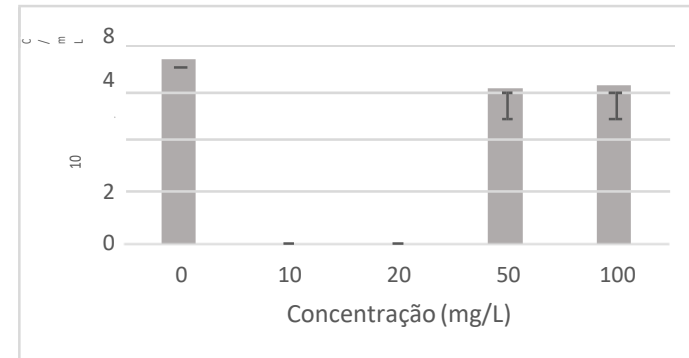
Resultados similares, porém, em menores concentrações, foram observados para DMAM. Intensa redução microbiana foi observada a 1 mg/L e inativação completa (0 log UFC/mL) a partir de 2 mg/L (Fig.12D).

Para todos os corantes as concentrações de 0 mg/L (Controles) foram estatisticamente semelhantes entre si. Todos os corantes apresentaram concentrações que expressaram a menor contagem de UFC (igual a zero), para o corante AM, tal condição foi observada nas concentrações de 50 e 100 mg/L, para o corante AB e AA nas concentrações de 10 e 20 mg/L e para o corante DMAM nas concentrações de 1, 2, 5 e 10 mg/L. As concentrações de 20 mg/L do corante AM, 50 e 100 mg/L dos corantes AB e AA, foram estatisticamente semelhantes entre si, e a concentração de 10 mg/L do corante AM foi estatisticamente semelhante as concentrações de 20 mg/L do mesmo corante e 50 e 100 mg/L do corante AB (anexo tabela 6).

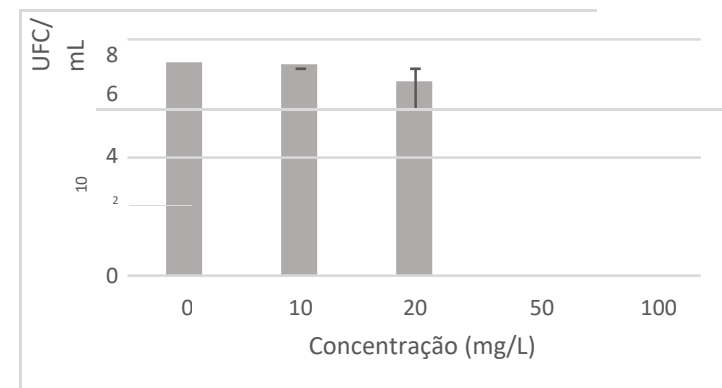
A) AZURE A



B) AZURE B



C) AZUL DE METILENO



D) DIMETIL AZUL DE METILENO

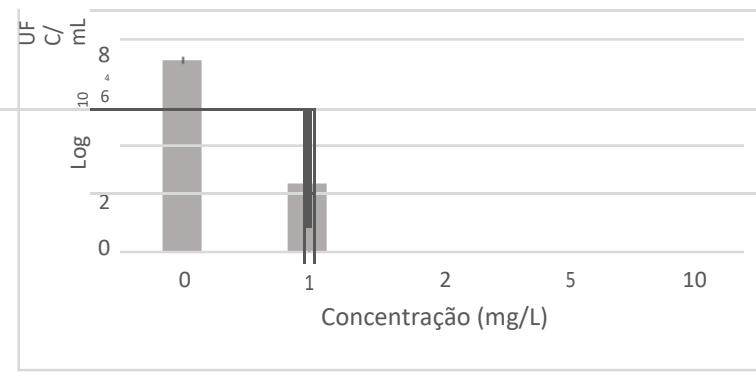


Figura 12. Avaliação da aPDT em suspensão de *S. aureus* no veículo água milli-Q sob o parâmetro de $11,2\text{mW/cm}^2$ $4,7\text{ J/cm}^2$, por 7 minutos. $n=9$. O inóculo bacteriano isento de agente FS foi considerado Controle (0). A) AA: a concentração de 0 mg/L (Controle) foi estatisticamente maior que todos os outros grupos, que foram semelhantes entre si; B) AB: as concentrações de 20 a 100mg/L apresentaram menores UFC que nas concentrações de 0 e 10mg/L a concentração de 0mg/L(Controle) estatisticamente apresentou o maior valor, as concentrações de 10 e 20mg/L apresentaram os menores valores, com nenhuma formação de colônia, a concentrações de 50 mg/L foram similares a todas as outras, exceto ao controle e a concentração de 100 mg/L apresentou valor intermediário sendo estatisticamente semelhante apenas a concentração de 50 mg/L; C) AM: as concentrações de 20 a 100mg/L apresentaram menores UFC

que nas concentrações de 0 e 10mg/L; D) DMAM: a concentração de 0mg/L (Controle) apresentou o maior valor e todas as demais concentrações foram significativamente menores que o controle e similares entre si, com 0 log UFC/mL.

4.3. Avaliação da eficácia dos fenotiazínicos

4.3.1. Comparação das diferentes concentrações do corante AA nos tratamentos aPDT e escuro

As comparações das concentrações e do tratamento aos quais o corante AA foi avaliado estão apresentadas na tabela 1. A análise estatística indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$). Nas concentrações de 0 e 100 mg/L, as amostras em tratamento com aPDT apresentaram contagem de UFC estatisticamente igual as amostras tratadas no escuro, nas demais concentrações o tratamento aPDT apresentou contagem UFC significativamente menor que o tratamento no escuro.

Considerando os dados obtidos, a concentração 10 e 20 mg/L apresentaram similar e melhor efeito em aPDT e todas as concentrações testadas não demonstraram significativa toxicidade no escuro.

Tabela 1. Mediana, valores mínimos e máximos do log das UFC/mL em amostras utilizando o corante AA em diferentes concentrações sob o tratamento de PDT e no escuro. Ao menos uma letra igual entre os grupos indica ausência de diferenças estatística.

Concentração (mg/L)	Log UFC/mL	
	PDT	Escuro
0	7,0 (6,8 – 7,3) ^{abc}	7,1 (6,7 – 7,3) ^{ab}
1	0 (0 - 0) ^g	7,1 (6,9 – 7,5) ^a
2	0 (0 - 0) ^g	6,8 (6,0 – 7,1) ^{bcu}
5	5,9 (5,4 – 6,5) ^{tg}	6,7 (6,0 – 7,2) ^{cae}
10	5,9 (5,6 – 6,8) ^{etg}	6,3 (5,6 – 6,8) ^{der}

UFC-Unidade formadora de colônia; aPDT – terapia fotodinâmica antimicrobiana

4.3.2. Comparação das diferentes concentrações do corante AB nos tratamentos aPDT e escuro

As comparações das concentrações e do tratamento aos quais o corante AB foi avaliado estão apresentadas na tabela 2. A análise estatística indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$). Em todas as concentrações, a amostra em tratamento com aPDT apresentou significativamente menos UFC

que as tratadas no escuro, exceto no grupo controle, onde ambas foram estatisticamente iguais.

Considerando os dados obtidos, a concentração 10 e 20 mg/L apresentaram similar e melhor efeito em aPDT e todas as concentrações testadas não demonstraram significante toxicidade no escuro.

Tabela 2. Mediana, valores mínimos e máximos do log das UFC/mL em amostras utilizando o corante AB em diferentes concentrações sob o tratamento de PDT e no escuro. Ao menos uma letra igual entre os grupos indica ausência de diferenças estatística.

Concentração (mg/L)	Log UFC /mL	
	PDT	Escuro
0	7,1 (6,9 – 7,3) ^a	7,1 (7,0 – 7,4) ^a
10	0 (0 - 0) ^u	7,2 (7,0 – 7,3) ^a
20	0 (0 - 0) ^u	7,1 (6,9 – 7,3) ^{ab}
50	6,1 (5,5 – 6,7) ^{cd}	7,1 (6,8 – 7,3) ^{ab}
100	6,3 (5,7 – 7,1) ^{dc}	7,2 (7,0 – 7,3) ^a

UFC-Unidade formadora de colônia; aPDT – terapia fotodinâmica antimicrobiana

4.3.3. Comparação das diferentes concentrações do corante AM nos tratamentos aPDT e escuro

As comparações das concentrações e do tratamento aos quais o corante AM foi avaliado estão apresentadas na tabela 3. A análise estatística indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$). Embora nas concentrações de 0mg/L (Controle) e 10mg/L não há diferenças significantes entre os tratamentos aPDT e escuro, nas concentrações de 20 a 100 mg/L há significantemente menos UFC nas amostras irradiadas que nas tratadas no escuro.

Considerando os dados obtidos, a concentração 50 e 100 mg/L apresentaram similar e melhor efeito em aPDT e todas as concentrações testadas não demonstraram significante toxicidade no escuro.

Tabela 3: Mediana, valores mínimos e máximos do log das UFC/mL em amostras utilizando o corante AM em diferentes concentrações sob o tratamento de PDT e no escuro. Ao menos uma letra igual entre os grupos indica ausência de diferenças estatística.

Concentração (mg/L)	Log UFC /mL	
	PDT	Escuro
0	7.2 (6,9 - 7,6) ^a	7.1 (6,8 - 7,7) ^{ab}
10	7.1 (6,8 - 7,5) ^{ab}	7.1 (6,9 - 7,3) ^{ab}
20	6.5 (5,7 - 7,0) ^{ca}	7.1 (6,9 - 7,3) ^{ab}
50	0 (0-0) ^a	7,0 (6,8 - 7,2) ^{bc}
100	0 (0-0) ^a	6,9 (6,8 - 7,2) ^{bc}

UFC - Unidade formadora de colônia; aPDT – terapia fotodinâmica antimicrobiana

4.3.4. Comparação das diferentes concentrações do corante DMAM nos tratamentos aPDT e escuro

As comparações das concentrações e do tratamento aos quais o corante DMAM foi avaliado estão apresentadas na tabela 4. A análise estatística indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$). Nas concentrações de 0 e 10 mg/L, as amostras em tratamento com aPDT apresentaram UFC estatisticamente igual as amostras tratadas no escuro, nas demais concentrações o tratamento no escuro apresentou significativamente mais UFC que o grupo com tratamento aPDT.

Considerando os dados obtidos, todas as concentrações testadas (1, 2, 5 e 10 mg/mL) apresentaram similar e melhor efeito em aPDT e somente a concentração 10mg/mL demonstrou toxicidade no escuro.

Tabela 4: Mediana, valores mínimos e máximos do log das UFC/mL em amostras utilizando o corante DMAM em diferentes concentrações sob o tratamento de PDT e no escuro. Ao menos uma letra igual entre os grupos indica ausência de diferenças estatística.

Concentração (mg/L)	Log UFC/mL	
	PDT	Escuro
0	7,2 (7,1 - 7,4) ^a	7,0 (6,6 - 7,2) ^{ab}
1	0 (0 - 0) ^c	6,9 (6,2 - 7,2) ^{ab}
2	0 (0 - 0) ^c	6,9(6,3 - 7,0) ^{ab}
5	0 (0 - 0) ^c	6,5 (5,7 - 6,8) ^d
10	0 (0 - 0) ^c	0 (0 - 0) ^c

UFC-Unidade formadora de colônia; aPDT – terapia fotodinâmica antimicrobiana

4.4 Incorporação de Fenotiazínicos

Os dados obtidos dos testes de incorporação dos FS mostraram que a incorporação de DMAM (86,9%) foi significativamente maior que a das amostras AA (30,7%) e AB (42,3%), que são similares entre si. A amostra AM apresentou a menor incorporação na série (8,9%), como demonstrado na Figura 13.

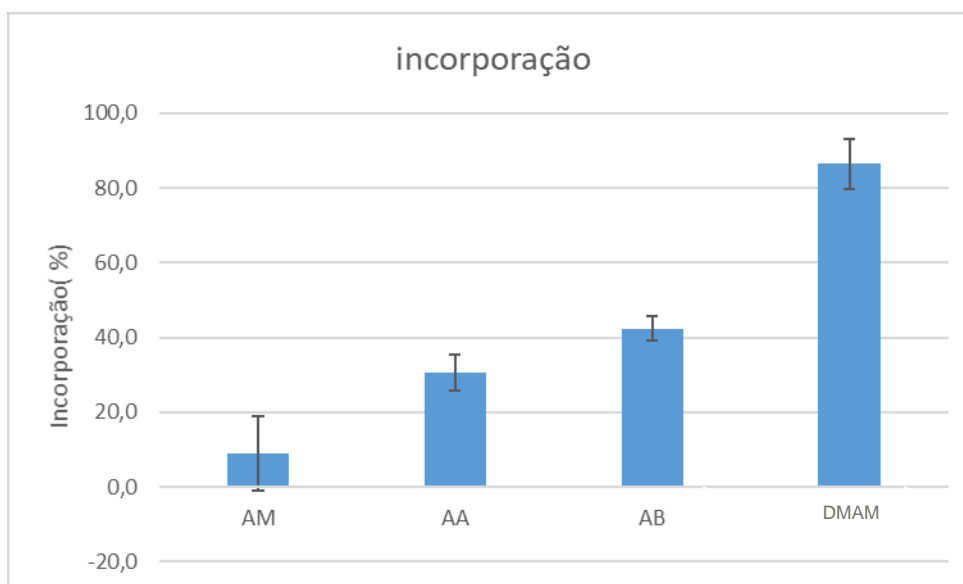


Figura 13. Quantificação por espectrofotometria de incorporação dos corantes fenotiazínicos AM(8,9%), AA(30,7%), AB(42,3%) e DMAM(86,9%) a 20mg/L em SDS a 0,25% com 3×10^8 UFC/mL. Cada FS foi quantificado no seu λ máximo, sendo o AM em 664 nm, AA em 630 nm, AB em 645 nm e DMAM em 653 nm. N=9.

5. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a toxicidade no escuro de quatro FS fenotiazínicos em variadas concentrações. Concentrações idênticas dos corantes também foram testadas sob aPDT.

As fenotiazinas exibem efeitos promissores contra microrganismos em aPTD, agindo em sistemas biológicos por meio da interação do sistema de anel multicíclico (interação π - π , intercalação no DNA) por meio da interação do substituinte farmacofórico (em alguns casos de comprimento estrito) e via lipofílica caráter que permite a penetração através das membranas biológicas.^{83,85}

A morte microbiana crescente e proporcional ao aumento da concentração dos corantes AA e AB foi verificada nos ensaios no escuro, porém o mesmo fato não foi constatado na aPDT, no qual houve morte total microbiana apenas em concentrações menores (10mg/L) assim como relatado por Collina⁷⁴

para AM em cultura de *Candida albicans*⁸¹. AA e AB foram FS pouco eficientes em aPDT para *C. albicans*, nas concentrações usadas nesse estudo. Similarmente, Francisco e colaboradores⁷⁰ mostraram maior eficácia de AM em relação ao AA e AB em células HeLa, efeito relacionado à metacromaticidade (agregação).⁷¹ A agregação é um parâmetro dependente da estrutura molecular do FS e demonstrou ser fator determinante para a eficácia da aPDT. Gualdesi e colaboradores mostraram a ausência de toxicidade de AB em MSSA e MRSA, havendo redução da sobrevivência em ambas as cepas quando associado à exposição à luz por 30 e 15 minutos, a 15,1 J/cm² e 7,6 J/cm², respectivamente com uma lâmpada Parathom[®] (OSRAM 5- W).

Por outro lado, para AM em todas as concentrações testadas no escuro não foi verificada ação antimicrobiana significativa em relação ao grupo controle, enquanto nos ensaios de aPDT constatou-se a erradicação bacteriana nas maiores concentrações de AM (100 e 200 mg/L). Acredita-se que justamente devido ao seu potencial, AM é mais estudado que outros compostos da série.

DMAM quando testado em concentrações idênticas ao AM, demonstrou erradicação microbiana mesmo no escuro. Em menores concentrações não há toxicidade no escuro e com a PDT a erradicação é atingida com 2 mg/L. A maior ação de DMAM em aPDT em relação aos demais fenotiazínicos foi verificada em outros estudos em *Candida albicans*^{71,81} e também em bactérias Gram positivas e Gram negativas.^{7,80,81}

Avaliação similar foi realizada no estudo de Pinheiro⁸³ que utilizou 300 µg/L de DMAM para os ensaios, *in vitro*, concluindo que aPDT utilizando laser, LED ou luz polarizada foi eficaz na redução da contagem de aeróbios e bactérias gram-positivas, anaeróbias e aerotolerantes, incluindo *S. aureus* (99,97% de redução).

A utilização de menores concentrações de DMAM também é constatada no estudo de Sampaio⁵⁹ que testou concentrações de 15 a 50.000 µg/L ou 125ng/mL do FS associado a Laser (660nm) e LED (632 ± 2nm) em diferentes densidades de energia (6, 12 e 18 J/cm²) no crescimento de *E. faecalis in vitro*. O estudo mostrou que a concentração era segura e 500 vezes abaixo da concentração estabelecida como tóxica.

Desta forma, os resultados mostraram um grande potencial de ação do DMAM. Embora sua estrutura seja similar aos demais fenotiazínicos, algumas propriedades podem estar relacionadas à maior ação, principalmente em termos de interação com membranas.^{68,90}

DMAM apresenta maior capacidade fotodinâmica que AM devido à amplificação da lipofilicidade, sendo esta propriedade considerada importante para o fotossensibilizador de incorporação intracelular.^{83,91}

Collina⁷⁴ já havia relatado maior incorporação de DMAM frente aos outros fenotiazínicos em *C.albicans*, sendo no mínimo 3 vezes maior. No presente estudo, em *S. aureus* foi verificado que a incorporação do DMAM se apresentou de 2 a quase 10 vezes maior que os outros fenotiazínicos estudados.

O DMAM é utilizado para quantificar matrizes de biofilme de *S. aureus*, visto que o DMAM forma um produto de complexação insolúvel com polissacarídeos sulfatados na matriz do biofilme bacteriano. Estes polissacarídeos são sintetizados pelas bactérias e podem estar diretamente ligados à superfície da parede celular ou somente presentes como produtos bacterianos excretados na matriz do biofilme. A quantidade de corante liberada pela adição de uma solução de descomplexação é medida espectrofotometricamente e reflete a quantidade de polissacarídeos sulfatados presentes na matriz do biofilme.⁹²⁹³

Neste sentido, considera-se que DMAM pode ser considerado o melhor FS da série, por apresentar maior incorporação, promover melhores resultados quando associado à aPDT podendo ser utilizado em menores concentrações.

6. CONCLUSÃO

A eficácia da aPDT envolve a otimização de grande número de parâmetros. Obviamente, a seleção de um FS é essencial para o sucesso da técnica. Dentre os fenotiazínicos testados neste estudo, DMAM apresentou os melhores resultados. DMAM demonstrou apresentar melhor incorporação celular bacteriana contribuindo para a ligação celular e dispersão intracelular em *S. aureus*, e eficaz ação antimicrobiana, além de demonstrar intensa absorção de luz no comprimento de onda de excitação em menor faixa de concentração, assegurando a possibilidade de toxicidade para seres humanos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Santos DM, Cutrim BDS, Oliveira PV de, et al. NOVAS ABORDAGENS EXPERIMENTAIS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES CAUSADAS POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS. *Rev Investig Biomédica*. 2018. doi:10.24863/rib.v10i1.197
2. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002. doi:10.1073/pnas.122108599
3. Cassettari VC, Strabelli T, Medeiros EAS. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? *Brazilian J Infect Dis*. 2005. doi:10.1590/s1413-86702005000100012
4. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico microbiológico. In: *Diagnóstico Microbiológico 5ª Edição*. ; 2001.
5. Santos AL dos, Santos DO, Freitas CC de, et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J Bras Patol e Med Lab*. 2007;43(6):413-423. doi:10.1590/S1676-24442007000600005
6. Leite DPV, Paolillo FR, Parmesano TN, Fontana CR, Bagnato VS. Effects of Photodynamic Therapy with Blue Light and Curcumin as Mouth Rinse for Oral Disinfection: A Randomized Controlled Trial. *Photomed Laser Surg*. 2014;32(11):627-632. doi:10.1089/pho.2014.3805
7. Pereira NM, Feitosa LS, Navarro RS, Kozusny-Andreani DI, Carvalho NMP. Use of photodynamic inactivation for in vitro reduction of prevalent bacteria in Fournier's Gangrene. *Int Braz J Urol*. 2018. doi:10.1590/S1677-5538.IBJU.2017.0312
8. Sharma M, Visai L, Bragheri F, Cristiani I, Gupta PK, Speziale P. Toluidine blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(1):299-305. doi:10.1128/AAC.00988-07

9. Wainwright M, Phoenix DA, Laycock SL, Wareing DRA, Wright PA. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 1998. doi:10.1016/S0378-1097(97)00545-4
10. Haat A; Weiland O - Asgeirsson HO <http://orcid.org/0000-0003-3869-8021>. *Staphylococcus aureus* bacteraemia and endocarditis-epidemiology and outcome: a review. *Infect Dis (Auckl)*. 2018. doi:<http://dx.doi.org/10.1080/23744235.2017.1392039>
11. Dos Santos AL, Santos DO, De Freitas CC, et al. *Staphylococcus aureus*: Visiting a strain of clinical importance. *J Bras Patol e Med Lab*. 2007. doi:10.1590/S1676-24442007000600005
12. Rout B, Liu CH, Wu WC. Increased anti-biofilm efficacy of toluidine blue on *Staphylococcus* species after nano-encapsulation. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018;21:190-200. doi:10.1016/j.pdpdt.2017.12.007
13. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol*. 2012;27(6):409-419. doi:10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x
14. Sztajer H, Szafranski SP, Tomasch J, et al. Cross-feeding and interkingdom communication in dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *ISME J*. 2014;8(11):2256-2271. doi:10.1038/ismej.2014.73
15. Soria-Lozano P, Gilaberte Y, Paz-Cristobal M, et al. In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. *BMC Microbiol*. 2015;15(1):1-8. doi:10.1186/s12866-015-0524-3
16. Szafranski SP, Deng ZL, Tomasch J, et al. Quorum sensing of *Streptococcus mutans* is activated by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and by the periodontal microbiome. *BMC*

Genomics. 2017;18(1):1-15. doi:10.1186/s12864-017-3618-5

17. Hajishengallis G, Lamont RJ. The polymicrobial synergy and dysbiosis model of periodontal disease pathogenesis. In: *The Human Microbiota and Chronic Disease: Dysbiosis as a Cause of Human Pathology*. ; 2016. doi:10.1002/9781118982907.ch14
18. Pereira AHC, Pinto JG, Freitas MAA, Fontana LC, Pacheco Soares C, Ferreira-Strixino J. Methylene blue internalization and photodynamic action against clinical and ATCC *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018. doi:10.1016/j.pdpdt.2018.02.008
19. Muller F. TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA CONTRA BACTÉRIAS GRAM -POSITIVAS: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE FOTOSSENSIBILIZANTES. 2006.
20. Pollitt EJG, Szkuta PT, Burns N, Foster SJ. *Staphylococcus aureus* infection dynamics. *PLoS Pathog*. 2018. doi:10.1371/journal.ppat.1007112
21. Kropec A, Maira-Litran T, Jefferson KK, et al. Poly-N-acetylglucosamine production in *Staphylococcus aureus* is essential for virulence in murine models of systemic infection. *Infect Immun*. 2005. doi:10.1128/IAI.73.10.6868-6876.2005
22. Alonso B, Lucio J, Pérez-Granda MJ, et al. Does biomass production correlate with metabolic activity in *Staphylococcus aureus*? *J Microbiol Methods*. 2016. doi:10.1016/j.mimet.2016.10.011
23. Jaśkiewicz M, Janczura A, Nowicka J, Kamysz W. Methods used for the eradication of staphylococcal biofilms. *Antibiotics*. 2019. doi:10.3390/antibiotics8040174
24. Sutherland IW. The biofilm matrix - An immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol*. 2001. doi:10.1016/S0966-842X(01)02012-1

25. Montanaro L, Poggi A, Visai L, et al. Extracellular DNA in biofilms. *Int J Artif Organs*. 2011. doi:10.5301/ijao.5000051
26. Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog*. 2008. doi:10.1371/journal.ppat.1000213
27. Okshevsky M, Meyer RL. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Crit Rev Microbiol*. 2015. doi:10.3109/1040841X.2013.841639
28. Huseby MJ, Kruse AC, Digre J, et al. Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. doi:10.1073/pnas.0911032107
29. Mann EE, Rice KC, Boles BR, et al. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One*. 2009. doi:10.1371/journal.pone.0005822
30. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*. 2012. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.05.031
31. Fernández-Barat L, Ben-Aicha S, Motos A, et al. Assessment of in vivo versus in vitro biofilm formation of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from endotracheal tubes. *Sci Rep*. 2018. doi:10.1038/s41598-018-30494-7
32. Svensäter G, Welin J, Wilkins JC, Beighton D, Hamilton IR. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett*. 2001. doi:10.1016/S0378-1097(01)00459-1
33. Rodríguez-Rojas A, Rodríguez-Beltrán J, Couce A, Blázquez J. Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. *Int J Med Microbiol*. 2013. doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.004

34. Murray, P.R.; Drew, W.L .; KOBAYASH, I G.S.; THOMPSON JH. *Microbiologia Médica*. (guanabara koogans, ed.); 1992.
35. Trabulsi LR, Toledo MRF de. Microbiologia. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006. doi:10.1590/s0036-46651991000400017
36. Branco TM, Valério NC, Jesus VIR, et al. Single and combined effects of photodynamic therapy and antibiotics to inactivate *Staphylococcus aureus* on skin. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018. doi:10.1016/j.pdpdt.2018.01.001
37. Hanakova A, Bogdanova K, Tomankova K, et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy on *S. aureus* and *E. coli* using porphyrin photosensitizers bound to cyclodextrin. *Microbiol Res*. 2014. doi:10.1016/j.micres.2013.07.005
38. Peacock SJ, Paterson GK. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem*. 2015. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034516
39. McCormack MG, Smith AJ, Akram AN, Jackson M, Robertson D, Edwards G. *Staphylococcus aureus* and the oral cavity: An overlooked source of carriage and infection? *Am J Infect Control*. 2015. doi:10.1016/j.ajic.2014.09.015
40. Abdulameer FH, Maki AM. Antibacterial Photodynamic Effect of 532 nm Diode-Pumped Solid State and 650 nm Diode Lasers on Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* in Vitro. 2017;16:21-26.
41. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. 2001;183(18):5385-5394. doi:10.1128/JB.183.18.5385-5394.2001
42. Livermore DM. Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact. *Clin Infect Dis*. 2003. doi:10.1086/344654

43. Fernandes KPS, França CM, Mesquita-Ferrari RA. *Biofotônica: Conceitos e Aplicações*. 1st ed. (Storopoli E, Storopoli Maria Cristina Barbosa, Miranda GP, Gutierrez DCC, Mafhuz GR, eds.). são paulo; 2017.
44. Chatzopoulos G, Doufexi A. Photodynamic therapy in the treatment of aggressive periodontitis: A systematic review. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal*. 2016;21(2):e192-e200. doi:10.4317/medoral.21046
45. Moslemi N, Soleiman-zadeh Azar P, Bahador A, et al. Inactivation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* by two different modalities of photodynamic therapy using Toluidine blue O or Radachlorin as photosensitizers: an in vitro study. *Lasers Med Sci*. 2014;30(1):89-94. doi:10.1007/s10103-014-1621-5
46. Meimandi M, Ardakani MRT, Nejad AE, Yousefnejad P, Saebi K, Tayeed MH. The effect of photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: A review of literature. *J Lasers Med Sci*. 2017;8(Suppl 1):S7-S11. doi:10.15171/jlms.2017.s2
47. Bacellar IOL, Tsubone TM, Pavani C, Baptista MS. Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death. *Int J Mol Sci*. 2015;16(9):20523-20559. doi:10.3390/ijms160920523
48. Misba L, Zaidi S, Khan AU. A comparison of antibacterial and antibiofilm efficacy of phenothiazinium dyes between Gram positive and Gram negative bacterial biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017. doi:10.1016/j.pdpdt.2017.01.177
49. Wikipedia. Jablonski diagram. *Wikimedia Found*. 2016. doi:10.1351/goldbook.J03360
50. de Juan A, Tauler R. Multivariate Curve Resolution (MCR) from 2000: Progress in concepts and applications. *Crit Rev Anal Chem*. 2006. doi:10.1080/10408340600970005
51. De Oliveira RR, De Lima KMG, De Juan A, Tauler R. Application of

- correlation constrained multivariate curve resolution alternating least-squares methods for determination of compounds of interest in biodiesel blends using NIR and UV-visible spectroscopic data. *Talanta*. 2014. doi:10.1016/j.talanta.2014.02.073
52. De Juan A, Tauler R. Chemometrics applied to unravel multicomponent processes and mixtures: Revisiting latest trends in multivariate resolution. In: *Analytica Chimica Acta*. ; 2003. doi:10.1016/S0003-2670(03)00724-4
 53. de Melo W de CMA, Perussi JR. Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos. *Rev Ciencias Farm Basica e Apl*. 2012;33(3):331-340.
 54. Kashef N, Akbarizare M, Razzaghi MR. In vitro activity of linezolid in combination with photodynamic inactivation against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2017.
 55. Kempa M, Kozub P, Kimball J, et al. Physicochemical properties of potential porphyrin photosensitizers for photodynamic therapy. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2015. doi:10.1016/j.saa.2015.03.076
 56. Siraj N, Kolic PE, Regmi BP, Warner IM. Strategy for Tuning the Photophysical Properties of Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. *Chem - A Eur J*. 2015. doi:10.1002/chem.201501686
 57. Gualdesi MS, Vara J, Pereyra L, Aiassa V, Igarzabal CIA, Ortiz CS. Halogenated phenothiazine as photoantimicrobial agent against *Staphylococcus aureus*. Evaluation of the vehiculization in polymeric nanoparticles. *Dye Pigment*. 2019. doi:10.1016/j.dyepig.2019.107625
 58. Oliveira SCPS, Santos GMP, Monteiro JSC, et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) using phenothiazines derivatives associated with the red laser against *staphylococcus aureus*. In: *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE*. ; 2013. doi:10.1117/12.2005560

59. Sampaio FJP, de Oliveira SCPS, Crugeira PJL, et al. aPDT using nanoconcentration of 1,9-dimethylmethylen blue associated to red light is efficacious in killing *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in vitro. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2019. doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.111654
60. Huang L, Xuan Y, Koide Y, Zhiyentayev T, Tanaka M, Hamblin MR. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. *Lasers Surg Med*. 2012. doi:10.1002/lsm.22045
61. Schultz HP, Schultz TP. Topological organic chemistry. 11. Graph theory and reciprocal Schultz-type molecular topological indices of alkanes and cycloalkanes. *J Chem Inf Comput Sci*. 1998;38(5):853-857. doi:10.1021/ci9800312
62. Núñez SC. Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul de orto-toluidina com relação à eficiência fotodinâmica. 2007.
63. Candeo LC, Rigonato-Oliveira NC, Brito AA, et al. Effects of periodontitis on the development of asthma: The role of photodynamic therapy. *PLoS One*. 2017;12(11). doi:10.1371/journal.pone.0187945
64. Xu S, Yuan Y, Cai X, et al. Tuning the singlet-triplet energy gap: A unique approach to efficient photosensitizers with aggregation-induced emission (AIE) characteristics. *Chem Sci*. 2015. doi:10.1039/c5sc01733e
65. Tim M. Strategies to optimize photosensitizers for photodynamic inactivation of bacteria. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2015. doi:10.1016/j.jphotobiol.2015.05.010
66. Francisco CML, Gonçalves MLA, Brum BS, et al. The photodynamic efficiency of phenothiazinium dyes is aggregation dependent. *New J Chem*. 2017;41(23):14438-14443. doi:10.1039/c7nj02173a
67. Wainwright M. The development of phenothiazinium photosensitisers.

Photodiagnosis Photodyn Ther. 2005;2(4):263-272.

68. Bacellar IOL, Pavani C, Sales EM, Itri R, Wainwright M, Baptista MS. Membrane damage efficiency of phenothiazinium photosensitizers. *Photochem Photobiol.* 2014. doi:10.1111/php.12264
69. Wainwright M. Photodynamic Therapy: The Development of New Photosensitisers. *Anticancer Agents Med Chem.* 2008. doi:10.2174/187152008783961888
70. Francisco CML, Gonçalves JMLA, Brum BS, et al. The photodynamic efficiency of phenothiazinium dyes is aggregation dependent. *New J Chem.* 2017. doi:10.1039/c7nj02173a
71. Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic inactivation of Bacillus spores, mediated by phenothiazinium dyes. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(11):6918-6925. doi:10.1128/AEM.71.11.6918-6925.2005
72. Monteiro JSC, Rangel EE, de Oliveira SCPS, et al. Enhancement of Photodynamic Inactivation of Planktonic Cultures of Staphylococcus aureus by DMMB-AuNPs. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020. doi:10.1016/j.pdpdt.2020.101930
73. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2003;71(1-3):87-98. doi:10.1016/j.jphotobiol.2003.06.002
74. Alves da Collina G, Freire F, da Silva Barbosa V, et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy action of phenothiazinium dyes in planktonic Candida albicans is increased in sodium dodecyl sulfate. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;29(November 2019):101612. doi:10.1016/j.pdpdt.2019.101612
75. Panhóca VH, Carreira Geralde M, Corrêa TQ, et al. Enhancement of the Photodynamic Therapy Effect on Streptococcus Mutans Biofilm. *J Phys Sci*

Appl. 2014;4(2):107-114.

76. Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2003;18(1):51-55. doi:10.1007/s10103-002-0243-5
77. Wainwright M, Mohr H, Walker WH. Phenothiazinium derivatives for pathogen inactivation in blood products. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2007. doi:10.1016/j.jphotobiol.2006.07.005
78. Núñez SC, Garcez AS, Kato IT, et al. Effects of ionic strength on the antimicrobial photodynamic efficiency of methylene blue. *Photochem Photobiol Sci.* 2014;13(3):595. doi:10.1039/c3pp50325a
79. Balata ML, Andrade LP de, Santos DBN, et al. Photodynamic therapy associated with full-mouth ultrasonic debridement in the treatment of severe chronic periodontitis: a randomized-controlled clinical trial. *J Appl Oral Sci.* 2013;21(2):208-214. doi:10.1590/1678-7757201302366
80. Vilela SFG, Junqueira JC, Barbosa JO, Majewski M, Munin E, Jorge AOC. Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms by malachite green and phenothiazine dyes: An in vitro study. *Arch Oral Biol.* 2012;57(6):704-710. doi:10.1016/j.archoralbio.2011.12.002
81. Briggs T, Blunn G, Hislop S, et al. Antimicrobial photodynamic therapy—a promising treatment for prosthetic joint infections. *Lasers Med Sci.* 2018. doi:10.1007/s10103-017-2394-4
82. Güzel Tunccan Ö, Kalkanci A, Unal EA, et al. The in vitro effect of antimicrobial photodynamic therapy on *Candida* and *Staphylococcus* biofilms. *Turkish J Med Sci.* 2018. doi:10.3906/sag-1803-44
83. Pinheiro ALB, Sampaio FJP, Santos de Almeida D, et al. Nanoconcentrations of 1,9-dimethylmethylene blue (DMMB) associated to laser, LED or polarized light are highly effective on AmPDT carried out in aerobes and aerotolerant anaerobes Gram-positive bacteria. In: ; 2020.

doi:10.1117/12.2543732

84. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1985.
85. Monteiro JSC, de Oliveira SCPS, Pires-Santos GM, Sampaio FJP, Zanin FAA, Pinheiro ALB. Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy on staphylococcus aureus using phenothiazinium dye with red laser . In: *Mechanisms for Low-Light Therapy X.* ; 2015. doi:10.1117/12.2079170
86. Vilela SFG, Junqueira JC, Barbosa JO, Majewski M, Munin E, Jorge AOC. Photodynamic inactivation of Staphylococcus aureus and Escherichia coli biofilms by malachite green and phenothiazine dyes: An in vitro study. *Arch Oral Biol.* 2012. doi:10.1016/j.archoralbio.2011.12.002
87. Ogawa A, Furukawa S, Fujita S, et al. Inhibition of Streptococcus mutans biofilm formation by Streptococcus salivarius FruA. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(5):1572-1580. doi:10.1128/AEM.02066-10
88. Lee YH, Park HW, Lee JH, Seo HW, Lee SY. The photodynamic therapy on Streptococcus mutans biofilms using erythrosine and dental halogen curing unit. *Int J Oral Sci.* 2013;4(4):196-201. doi:10.1038/ijos.2012.63
89. Alvarenga LH, Prates RA, Yoshimura TM, et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilm can be inactivated by methylene blue-mediated photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015;12(1):131-135. doi:10.1016/j.pdpdt.2014.10.002
90. Paz-Cristobal MP, Royo D, Rezusta A, et al. Photodynamic fungicidal efficacy of hypericin and dimethyl methylene blue against azole-resistant Candida albicans strains. *Mycoses.* 2014. doi:10.1111/myc.12099
91. Monteiro JSC, de Oliveira SCPS, Pires Santos GM, Pires Sampaio FJ, Pinheiro Soares LG, Pinheiro ALB. Effectiveness of antimicrobial

- photodynamic therapy (AmPDT) on *Staphylococcus aureus* using phenothiazine compound with red laser. *Lasers Med Sci.* 2017;32(1):29-34. doi:10.1007/s10103-016-2079-4
92. Toté K, Berghe D Vanden, Maes L, Cos P. A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lett Appl Microbiol.* 2008. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02298.x
93. Piva E, Barbosa JDO, Rossoni RD, Vilela SFG, Jorge AOC, Junqueira JC. Interação entre *Escherichia coli* e *Candida albicans* em biofilmes formados in vitro: análise da viabilidade celular por método colorimétrico. *Rev Odontol da UNESP.* 2011;40(5):222-227.

Anexos:

Tabela 5: Média e desvio padrão do log das UFC/mL em amostras utilizando quatro corantes em diferentes concentrações sob o tratamento de PDT.

Corante	Concentração (mg/L)	Log UFC/mL
AM	0	7,3 (0,2)
	10	7,2 (0,2)
	20	6,5 (0,4)
	50	0 (0)
	100	0 (0)
AB	0	7,1 (0,1)
	10	0 (0)
	20	0 (0)
	50	6,1 (0,4)
	100	6,4(0,6)
DMAM	0	7,2 (0,1)
	1	0 (0)
	2	0 (0)
	5	0 (0)
	10	0 (0)
AA	0	7,0 (0,2)
	10	0 (0)
	20	0 (0)
	50	5,9 (0,3)
	100	6,0 (0,4)

Tabela 6: Média e desvio padrão do log das UFC/mL em amostras tratadas no escuro utilizando quatro corantes em diferentes concentrações.

Corante	Concentração(mg/L)	Log UFC/mL
AM	0	7,2 (0,3)
	10	7,1 (0,2)
	20	7,1 (0,1)
	50	7,0 (0,1)
	100	7,0 (0,2)
AB	0	7,2 (0,1)
	10	7,2 (0,1)
	20	7,1 (0,1)
	50	7,1 (0,2)
	100	7,2 (0,1)
DMAM	0	7,0 (0,2)
	1	6,9 (0,3)
	2	6,8 (0,2)
	5	6,4 (0,4)
	10	0 (0)
AA	0	7,0 (0,2)
	10	7,1(0,2)
	20	6,8 (0,3)
	50	6,6 (0,4)
	100	6,2 (0,4)