



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA -
BIOFOTÔNICA

BRUNO DE SOUZA FERREIRA

EFEITOS DE FORMULAÇÕES LÍQUIDAS E EM GEL NA
TERAPIA FOTODINÂMICA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E DA BIOCOMPATIBILIDADE CELULAR

São Paulo, SP

2025



BRUNO DE SOUZA FERREIRA

**EFEITOS DE FORMULAÇÕES LÍQUIDAS E EM GEL NA
TERAPIA FOTODINÂMICA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E DA BIOCOMPATIBILIDADE CELULAR**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
da Universidade Nove de Julho, para obtenção do título
de Mestre em Medicina - Biofotônica.**

**Orientadora: Profa. Dra. Anna Carolina Ratto
Tempestini Horliana**

São Paulo, SP

2025

Ferreira, Bruno de Souza.

Efeitos de formulações líquidas e em gel na terapia fotodinâmica:
avaliação da atividade antimicrobiana e da biocompatibilidade celular.

/ Bruno de Souza Ferreira. 2025.

78 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho -
UNINOVE, São Paulo, 2025.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Anna Carolina Ratto Tempestini
Horliana.

1. Staphylococcus aureus. 2. Terapia fotodinâmica
antimicrobiana. 3. Azul de metileno. 4. Biocompatibilidade
celular. 5. Fibroblastos L929.

I. Horliana, Anna Carolina Ratto Tempestini.

II. Título.

CDU 615.831

São Paulo, 17 de dezembro de 2025.

TERMO DE APROVAÇÃO

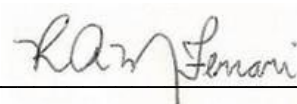
Aluno (a): Bruno de Souza Ferreira

Título da Dissertação: “Efeitos de formulações líquidas e em gel na terapia fotodinâmica: avaliação da atividade antimicrobiana e da biocompatibilidade celular”.

Presidente: PROF^a. DR^a. ANNA CAROLINA RATTO TEMPESTINI HORLIANA



Membro: PROF^a. DR^a. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI



Membro: PROF^a. DR^a. ILKA TIEMY KATO PRATES



FINANCIAMENTOS

O PRESENTE TRABALHO FOI REALIZADO COM APOIO DA UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO (UNINOVE) – PROGRAMA DE BOLSAS PARA A FORMAÇÃO DO PESQUISADOR.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, José Roberto da Silva Ferreira, que partiu há tão pouco tempo e cuja ausência ainda estou aprendendo a entender. A saudade é constante e me acompanha todos os dias.

Dedico este trabalho à sua memória.

Em um lugar onde a vida continua, sei que nos veremos novamente.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana, deixo minha mais profunda gratidão. Não apenas pela excelência científica, mas também pela forma humana, preocupada e generosa, com que conduziu cada etapa da minha formação. Obrigado por acreditar em mim, por me orientar com firmeza e carinho, e por ser essa profissional inspiradora que me guia desde antes do mestrado.

À Prof.^a Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes, agradeço pela oportunidade de fazer parte deste Programa e pela liderança firme e acolhedora que torna possível o desenvolvimento de trabalhos como este.

À Universidade Nove de Julho - UNINOVE, agradeço pelo acolhimento e pela estrutura e pelos recursos que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Ellen Sayuri Ando Sugimoto, minha gratidão especial. Obrigado pela dedicação, pela paciência e pela presença constante ao longo deste percurso. Sou muito grato por tudo, de verdade.

Aos professores Renato Araújo Prates, Raquel Agnelli Mesquita Ferrari, Cinthya Cosme Gutierrez Duran e Sandra Kalil Bussadori, agradeço pelo conhecimento compartilhado, pelas conversas e pelos ensinamentos que ampliaram minha visão científica.

Aos colegas de laboratório que estiveram comigo ao longo deste caminho e a todos que, de alguma forma, contribuíram para a construção deste trabalho, deixo minha sincera gratidão.

RESUMO

Staphylococcus aureus é um patógeno Gram-positivo associado à infecções graves, e o aumento da resistência antimicrobiana destaca a aPDT como uma alternativa promissora devido à sua ação eficaz e à ausência de indução de resistência. O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, um protocolo otimizado de aPDT para a descolonização de *S. aureus*, comparando azul de metileno em solução líquida (0,005% e 0,01%) e em gel (0,01%), sob diferentes tempos de pré-irradiação (3 e 5 min), além de investigar a citotoxicidade e a biocompatibilidade das formulações líquidas em fibroblastos L929. Para garantir a padronização da carga bacteriana utilizada nos ensaios, foi estabelecido o momento de maior atividade de crescimento da bactéria, assegurando reprodutibilidade experimental. Foram realizados experimentos para avaliar a atividade da aPDT em culturas planctônicas nos grupos organizados em: (i) controle, sem tratamento; (ii) laser, submetido apenas à irradiação; (iii) AM, incubado com 0,005% ou 0,01%, em formulação líquida ou em gel, com tempos de pré-irradiação de 3 ou 5 minutos; e (iv) aPDT, combinando AM (0,005% ou 0,01%, líquido ou gel) e laser, após pré-irradiação de 3 ou 5 minutos. As irradiações foram realizadas com um protótipo de laser (400 mW, 120 J por ponto, 660 nm). Após os tratamentos, as amostras foram diluídas, plaqueadas em ágar BHI e incubadas por 24 h para determinação de UFC/mL. A biocompatibilidade foi avaliada em fibroblastos murinos L929, nos mesmos grupos experimentais (exceto AM gel). As células foram tratadas e analisadas após 24 e 48 h, por meio dos ensaios MTT, Cristal Violeta e teste de Griess. Como resultado, a padronização da curva, na fase exponencial (mid-log) foi atingida em ≈ 5 h, com OD600 $\approx 0,7$ (2×10^8 UFC/mL). Tanto o laser isolado quanto o AM não promoveram redução de UFC/mL, enquanto a combinação laser + AM líquido, em ambas as concentrações, resultou em inativação parcial após 3 min de pré-irradiação, e total após 5 min. A formulação em gel de azul de metileno a 0,01% não promoveu redução do crescimento bacteriano, independentemente do tempo de pré-irradiação avaliado (3 ou 5 minutos). Nos fibroblastos L929, os grupos controle, laser isolado e AM isolado mantiveram morfologia, monocamada e viabilidade metabólica preservadas, enquanto os grupos submetidos à aPDT (laser + AM 0,005% e 0,01%) exibiram perda acentuada de células aderidas, baixa retenção de Cristal Violeta e redução da viabilidade no ensaio de MTT. As dosagens de nitrito (24 e 48 h) não mostraram aumento entre os grupos. Podemos concluir que a aPDT com AM líquido mostrou eficácia na inativação de *S. aureus*, especialmente após 5 minutos de pré-irradiação em ambas as concentrações, enquanto o gel apresentou desempenho limitado. Contudo, a combinação AM + laser apresentou citotoxicidade em fibroblastos murinos L929.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, terapia fotodinâmica antimicrobiana, azul de metileno, biocompatibilidade celular, fibroblastos L929.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a Gram-positive pathogen associated with severe infections, and the increasing antimicrobial resistance highlights antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) as a promising alternative due to its effective action and lack of resistance induction. The aim of this study was to evaluate, in vitro, an optimized aPDT protocol for the decolonization of *S. aureus*, comparing methylene blue in liquid solution (0.005% and 0.01%) and gel formulation (0.01%), under different pre-irradiation times (3 and 5 min), as well as to investigate the cytotoxicity and biocompatibility of the liquid formulations in L929 fibroblasts. To ensure standardization of the bacterial load used in the assays, the time point of highest bacterial growth activity was established, ensuring experimental reproducibility. Experiments were performed to assess aPDT activity in planktonic cultures, with groups organized as follows: (i) control, without treatment; (ii) laser, subjected only to irradiation; (iii) MB, incubated with 0.005% or 0.01% methylene blue, in liquid or gel formulation, with pre-irradiation times of 3 or 5 minutes; and (iv) aPDT, combining methylene blue (0.005% or 0.01%, liquid or gel) and laser after 3 or 5 minutes of pre-irradiation. Irradiations were performed using a laser prototype (400 mW, 120 J per point, 660 nm). After treatment, samples were diluted, plated on BHI agar, and incubated for 24 h for CFU/mL determination. Biocompatibility was assessed in murine L929 fibroblasts using the same experimental groups, except for the MB gel. Cells were treated and analyzed after 24 and 48 h using MTT, Crystal Violet, and Griess assays. Curve standardization at the exponential growth phase (mid-log) was achieved at approximately 5 h, with OD600 $\approx$ 0.7 (2×10^8 CFU/mL). Neither laser irradiation alone nor methylene blue alone promoted CFU/mL reduction, whereas the combination of laser and liquid methylene blue at both concentrations resulted in partial inactivation after 3 minutes of pre-irradiation and complete inactivation after 5 minutes. The 0.01% methylene blue gel formulation did not reduce bacterial growth, regardless of the pre-irradiation time evaluated (3 or 5 minutes). In L929 fibroblasts, control, laser-only, and methylene blue-only groups preserved morphology, monolayer integrity, and metabolic viability, whereas groups subjected to aPDT (laser + methylene blue at 0.005% and 0.01%) exhibited marked loss of adherent cells, low Crystal Violet retention, and reduced viability in the MTT assay. Nitrite levels at 24 and 48 h did not increase among the groups. It can be concluded that aPDT using liquid methylene blue was effective in the inactivation of *S. aureus*, particularly after 5 minutes of pre-irradiation at both concentrations, while the gel formulation showed limited performance. However, the combination of methylene blue and laser exhibited cytotoxicity in murine L929 fibroblasts.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, antimicrobial photodynamic therapy, methylene blue, cellular biocompatibility, L929 fibroblasts.

DESTAQUES

- O estudo padronizou a fase mid-log de *S. aureus*, garantindo a reprodutibilidade dos ensaios microbiológicos.
- A combinação Laser + AM líquido demonstrou eficácia com inativação total após 5 minutos de pré-irradiação, em ambas as concentrações (0,005% e 0,01%).
- A combinação Laser + AM líquido mostrou inativação parcial após 3 minutos de pré-irradiação em ambas as concentrações, indicando que esse tempo não é suficiente para a entrada adequada do AM nas bactérias.
- A comparação direta mostrou que o AM em gel não apresentou atividade fotodinâmica significativa, o que evidencia a superioridade da formulação líquida.
- O laser e o AM isolados foram biocompatíveis, enquanto a aPDT reduziu a viabilidade e a integridade celular.
- A análise de nitrito indicou que não houve alteração nos níveis avaliados, reforçando que os efeitos celulares da aPDT não estão associados à indução de NO.

HIGHLIGHTS

- The study standardized the mid-log phase of *S. aureus*, ensuring reproducibility of the microbiological assays.
- The combination of laser + liquid MB achieved complete inactivation after 5 minutes of pre-irradiation at both concentrations (0.005% and 0.01%).
- The combination of laser + liquid MB showed partial inactivation after 3 minutes of pre-irradiation at both concentrations, indicating that this exposure time is insufficient for adequate MB uptake by the bacteria.
- The direct comparison showed that MB gel exhibited no significant photodynamic activity, highlighting the superiority of the liquid formulation.
- Laser and MB alone were biocompatible, whereas aPDT reduced cell viability and monolayer integrity.
- Nitrite analysis indicated that there was no change in the levels evaluated, reinforcing that the cellular effects of aPDT are not associated with NO induction.

RESUMO PARA LEIGOS

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria que pode causar infecções sérias, e muitas vezes torna-se resistente aos antibióticos. Por isso, novas formas de tratamento estão sendo estudadas. Uma delas é a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT), que combina um corante, o azul de metileno, com a luz de um laser para eliminar microrganismos. Neste estudo, testamos diferentes versões do azul de metileno (líquido e em gel) e diferentes tempos de espera (3 e 5 min) antes da aplicação do laser. Descobrimos que a combinação do azul de metileno líquido com o laser eliminou totalmente as bactérias após 5 minutos de pré-irradiação, e reduziu parcialmente após 3 minutos. Já o azul de metileno em gel não funcionou bem nas condições testadas. Também avaliamos se esses tratamentos poderiam prejudicar células saudáveis, como os fibroblastos. O laser e o azul de metileno, usados separadamente, foram seguros, mas, quando combinados (aPDT), causaram danos às células em laboratório. Por outro lado, não houve sinais de inflamação celular envolvendo óxido nítrico. Em resumo, a técnica mostra bom potencial para eliminar o *S. aureus*, especialmente com o azul de metileno líquido, mas ainda precisa ser ajustada para não prejudicar células humanas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma do delineamento experimental dos ensaios de aPDT em <i>S. aureus</i>	36
Figura 2 - Protótipo do equipamento laser utilizado no estudo	36
Figura 3 - Fluxograma do delineamento experimental dos ensaios de aPDT em fibroblastos L929	39
Figura 4 - Curva de crescimento de <i>S. aureus</i> com leituras de absorbância	43
Figura 5 - Imagens de placas de cultura após o crescimento de colônias bacterianas de <i>S. aureus</i> em diferentes diluições do experimento. A) Diluição 10^{-5} ; (B) Diluição 10^{-6} ; (C) Diluição 10^{-7}	44
Figura 6 - Contagem de UFC/mL após tratamento com AM 0,005% e 3 ou 5 min de pré-irradiação	46
Figura 7 - Placas de cultivo bacteriano após tratamentos com AM 0,005% e 3 min de pré-irradiação	46
Figura 8 - Placas de cultivo bacteriano após tratamentos com AM 0,005% e 5 min de pré-irradiação	47
Figura 9 - Contagem de UFC/mL após tratamento com AM 0,01% e 3 ou 5 min de pré-irradiação	48
Figura 10 - Placas de cultivo bacteriano após tratamentos com AM 0,01% e 3 min de pré-irradiação	49
Figura 11 - Placas de cultivo bacteriano após tratamentos com AM 0,01% e 5 min de pré-irradiação	49
Figura 12 - Contagem de UFC/LI após tratamento com AM gel 0,01% e 3 ou 5 min de pré-irradiação	51
Figura 13 - Placas de cultivo de <i>S. aureus</i> tratadas com AM gel 0,01% e 3 min de pré-irradiação	51
Figura 14 - Placas de cultivo de <i>S. aureus</i> tratadas com AM gel 0,01% e 3 min de pré-irradiação	52
Figura 15 - Morfologia de fibroblastos L929 após 24h de incubação. Imagens obtidas em triplicata. Aumento:100um, utilizando o microscópio ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad).	54
Figura 16 - Morfologia de fibroblastos L929 após 48h de incubação. Imagens obtidas em triplicata. Aumento:100um, utilizando o microscópio ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad).	56
Figura 17 - Viabilidade celular no ensaio de MTT após 24 horas	58
Figura 18 - Viabilidade celular no ensaio de MTT após 48 horas	59
Figura 19 - Cristal violeta após 24 horas	61
Figura 20 - Cristal violeta após 48 horas	62
Figura 21 - Concentração de nitrito após 24 horas	63
Figura 22 - Concentração de nitrito após 48 horas	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Delineamento experimental dos grupos de aPDT em <i>S. aureus</i>	35
Tabela 2 - Parâmetros dosimétricos do protótipo de laser a 660 nm empregado nos ensaios de aPDT.....	37
Tabela 3 - Delineamento experimental dos grupos de aPDT em fibroblastos L929	38
Tabela 4 - Contagem de colônias e estimativa de UFC/mL de <i>Staphylococcus aureus</i>	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aPDT – Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

AM – Azul de Metileno

ATCC – American Type Culture Collection

ATP – Adenosine Triphosphate

BHI – Brain Heart Infusion

CFU / UFC – Colony-Forming Unit / Unidade Formadora de Colônia

cm² – Centímetro quadrado

CO₂ – Dióxido de Carbono

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DO₆₀₀ – Densidade Óptica a 600 nm

DP – Desvio Padrão

FBS / SFB – Fetal Bovine Serum / Soro Fetal Bovino

J – Joule

L929 – Linhagem de fibroblastos murinos L929

MB/AM – Methylene Blue / Azul de Metileno

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

mg/mL – Miligrama por mililitro

mL / µL – Mililitro / Microlitro

mW – Miliwatt

nm – Nanômetro

NO – Óxido Nítrico

PBS – Phosphate-Buffered Saline

ROS – Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio)

rpm – Rotações por minuto

SUMÁRIO

1.	CONTEXTUALIZAÇÃO	17
1.1.	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	17
1.2.	COLONIZAÇÃO E RISCO DE INFECÇÃO	17
1.3.	TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (APDT) E SUA APLICAÇÃO NO STAPHYLOCOCCUS AUREUS	21
1.4.	MECANISMOS DE AÇÃO NO STAPHYLOCOCCUS AUREUS	23
1.5.	AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA EM CÉLULAS	26
2.	JUSTIFICATIVA	30
	OBJETIVOS GERAIS	32
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4.	METODOLOGIA	34
4.1.	ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS DE CRESCIMENTO, PADRONIZAÇÃO E INATIVAÇÃO BACTERIANA POR APDT	34
4.1.1.	Cepa bacteriana e curva de crescimento	34
4.2.	ANÁLISE COMPARATIVA DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES DE AZUL DE METILENO E DOS TEMPOS DE PRÉ-IRRADIAÇÃO NO DESEMPENHO DA APDT EM STAPHYLOCOCCUS AUREUS	34
4.2.1.	Desenho experimental	34
4.3.	TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA	36
4.3.1.	Protótipo Laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation)	36
4.4.	ATIVIDADE DA APDT EM CULTURA DE S. AUREUS PLANCTÔNICOS	37
4.5.	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, VIABILIDADE CELULAR E ESTRESSE OXIDATIVO EM FIBROBLASTOS L929	38
4.5.1.	Desenho experimental	38
4.5.2.	Atividade do azul de metileno em fibroblastos L929	39
4.5.3.	Ensaio de viabilidade MTT	40
4.5.4.	Ensaio de integridade de monocamada – Cristal Violeta	40
4.5.5.	Quantificação de óxido nítrico – Griess Test	41
4.6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42

5.	RESULTADOS.....	43
5.1.	RESULTADOS DOS ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS DE CRESCIMENTO, PADRONIZAÇÃO E INATIVAÇÃO BACTERIANA POR APDT.....	43
5.1.1.	<i>Curva de Crescimento de Staphylococcus aureus</i>	43
5.1.2.	<i>Contagem de Colônias</i>	43
5.2.	RESULTADOS DA ANÁLISE COMPARATIVA DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES DE AZUL DE METILENO E DOS TEMPOS DE PRÉ-IRRADIAÇÃO NO DESEMPENHO DA APDT EM STAPHYLOCOCCUS AUREUS.....	45
5.2.1.	<i>Resultados da aPDT com AM 0,005% e 3 ou 5 minutos de pré-irradiação</i>	45
5.2.2.	<i>Resultados da aPDT com AM 0,01% e 3 ou 5 minutos de pré-irradiação</i>	47
5.2.3.	<i>Resultados da aPDT com AM Gel 0,01% e 3 minutos de pré-irradiação</i>	50
5.3.	RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, VIABILIDADE CELULAR E RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM FIBROBLASTOS L929	52
5.3.1.	<i>Resultados da Morfologia Celular (Microscopia Óptica – 24h)</i>	52
5.3.2.	<i>Resultados da Morfologia Celular (Microscopia Óptica – 48h)</i>	55
5.3.3.	<i>Viabilidade Celular – Ensaio de MTT</i>	57
5.3.4.	<i>Integridade da Monocamada – Ensaio de Cristal Violeta</i>	59
5.3.5.	<i>Produção de Nitrito – Teste de Griess</i>	62
6.	DISCUSSÃO	65
7.	CONCLUSÃO	69
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

O *S. aureus* foi descrito pela primeira vez em 1880 pelo cirurgião escocês Sir Alexander Ogston, que observou a bactéria em abscessos supurados de pacientes. Durante esse período, notou que essa bactéria se organizava em grupos, semelhantes a cachos de uva, e produzia colônias de cor dourada, características que deram origem ao nome "aureus", derivado do latim "dourado" (OGSTON, 1984). *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva, imóvel, aeróbia facultativa, pertencente à família *Micrococcaceae*, catalase e coagulase positivas (LOWY, 1998).

Embora o *S. aureus* seja encontrado na microbiota residente do corpo humano, tem sido amplamente associado a infecções graves, especialmente em feridas cirúrgicas e em ambientes hospitalares (PALIKHEY *et al.*, 2023; BAWANKAR *et al.*, 2025; TROEMAN *et al.*, 2023)

No início do século XX, a mortalidade associada às infecções por *S. aureus* era elevada, principalmente devido à falta de tratamentos eficazes. Infecções pós-cirúrgicas e feridas infectadas representavam um grande desafio para a medicina hospitalar, particularmente à medida que o número de procedimentos cirúrgicos aumentava. Com o avanço das técnicas cirúrgicas, de esterilização e do uso de antibióticos, houve um controle mais eficaz dessas infecções. No entanto, a capacidade do *S. aureus* de sobreviver em diferentes ambientes e de desenvolver resistência manteve sua relevância como patógeno clínico preocupante (IOANNOU *et al.*, 2023).

1.2. COLONIZAÇÃO E RISCO DE INFECÇÃO

O *S. aureus* representa um sério desafio à saúde pública devido ao aumento contínuo da resistência aos antibióticos, tornando indispensável a busca por estratégias terapêuticas alternativas (Mohammad *et al* 2025). A cavidade nasal é uma das principais áreas de colonização do *S. aureus* em seres humanos, com estimativas indicando que até 30% da população seja portadora assintomática da bactéria (KRISMER *et al.*, 2017; LAUX *et al.*, 2019). Embora a maioria desses

portadores não apresente sinais de infecção ativa, a colonização nasal é um fator de risco significativo para o desenvolvimento de infecções graves, especialmente em indivíduos imunocomprometidos ou submetidos a procedimentos médicos invasivos, e pode ser transmitida de um indivíduo a outro (MENGISTU *et al.*, 2025; HU *et al.*, 2025).

S. aureus é mais frequentemente encontrado na parte anterior da cavidade nasal, associado às células epiteliais e ao debris mucoso, e a interação entre os fatores produzidos pelas células humanas e pelas bactérias é essencial para o sucesso da colonização da superfície epitelial (PIEWNGAM; OTTO, 2024). A colonização nasal por *S. aureus* ocorre devido à interação da bactéria com o ambiente úmido das narinas e à presença de receptores que facilitam a adesão bacteriana (CHEN; MA; XIAO, 2025). A bactéria utiliza adesinas, como as proteínas de ligação à fibronectina e ao fibrinogênio, para se fixar às células epiteliais nasais, permitindo a manutenção de uma colonização persistente (TOUAITIA *et al.*, 2025). A capacidade de *S. aureus* formar biofilme na cavidade nasal ainda é considerada controversa. Evidências indicam que, em indivíduos saudáveis, a colonização ocorre predominantemente de forma dispersa e intermitente, com baixo número de bactérias recuperadas em amostras de swab nasal, o que sugere a ausência de um biofilme estável e duradouro (PIEWNGAM; OTTO, 2024). Além disso, estudos realizados com modelo animal, mostraram uma colonização dispersa, com bactérias individuais ou formando pequenos grupos, na região nasal anterior (SILVA *et al.*, 2024).

Por outro lado, *S. aureus* tem a habilidade de formar biofilme tanto *in vitro* quanto em superfícies abióticas (WIELAND *et al.*, 2025). A formação de biofilme por *S. aureus* pode ser observada juntamente com outras bactérias em amostras de mucosa de pacientes com rinosinusite e em casos de fibrose cística (Sanderson *et al.*, 2006; SHAGHAYEGH *et al.*, 2022; JEAN-PIERRE *et al.*, 2022).

Embora essa colonização seja frequentemente assintomática, ela pode servir como fonte de disseminação bacteriana para outras partes do corpo ou para terceiros, especialmente em ambientes hospitalares e em indivíduos vulneráveis (DINH *et al.*, 2025).

Entre os grupos de risco, uma das principais causas de infecção em recém-nascidos em hospitais é a de *S. aureus*, assim como em idosos (JENNINGS *et al.*, 2025; HOFFMAN *et al.*, 2025). Além disso, os pacientes submetidos a tratamento

hemodialítico destacam-se como especialmente suscetíveis a infecções associadas à colonização nasal por *S. aureus* (SILVA *et al.*, 2020). Esses pacientes, frequentemente com comprometimento do sistema imunológico e expostos a procedimentos médicos repetidos, apresentam risco elevado de desenvolver bacteremia e outras infecções graves (SAKR *et al.*, 2018). Estudos demonstram que pacientes em hemodiálise colonizados por *S. aureus* na cavidade nasal têm maior probabilidade de desenvolver infecções relacionadas à corrente sanguínea, frequentemente associadas ao uso de cateteres venosos centrais, dispositivos essenciais no tratamento dialítico (MANDOLFO *et al.*, 2025; BRYCE *et al.*, 2024).

Essa associação entre colonização nasal e infecções graves deve-se, em parte, ao fato de que o *S. aureus* presente nas narinas pode ser facilmente transferido para outros locais do corpo durante procedimentos médicos ou por meio do contato com dispositivos médicos invasivos (PIEWNGAM; OTTO, 2024; BEZERRA *et al.*, 2025).

Em pacientes em tratamento hemodialítico, o acesso frequente ao sistema vascular através de cateteres cria uma porta de entrada direta para a bactéria na corrente sanguínea, e pode causar bacteremia, sepse e endocardite, complicações que aumentam significativamente a morbidade e mortalidade (BITUNGURAMYE *et al.*, 2024). Além disso, o risco de infecção sanguínea entre os pacientes renais crônicos dialíticos portadores nasais de *S. aureus* é quatro vezes maior em relação aos não portadores (HERWALDT *et al.*, 1998, CHOW *et al.*, 1989).

A colonização nasal por *S. aureus* também é particularmente preocupante em ambientes hospitalares, onde a transmissão entre pacientes e profissionais de saúde pode ocorrer com facilidade (WANG *et al.*, 2024). Pacientes colonizados podem servir como reservatórios para a disseminação de cepas de *S. aureus*, incluindo as resistentes a antibióticos, como o MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), o que aumenta o risco de surtos hospitalares (SUBBA; TSERING, 2025). Em consequência, o rastreamento e o tratamento da colonização nasal em populações de risco, como os pacientes em diálise, têm se tornado uma estratégia crucial para o controle da disseminação do *S. aureus* em ambientes hospitalares (PIEWNGAM; OTTO, 2024).

Medidas preventivas, como a descolonização nasal com agentes antimicrobianos, como a mupirocina, têm sido amplamente estudadas e aplicadas

em pacientes de alto risco, incluindo aqueles em hemodiálise, para reduzir a incidência de infecções relacionadas ao *S. aureus* (BEZERRA *et al.*, 2025).

A mupirocina é um antibiótico tópico derivado do ácido pseudomônico, produzido pela bactéria *Pseudomonas fluorescens*, com eficácia comprovada na erradicação da colonização por *S. aureus*, incluindo cepas resistentes como o MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) (PAPPA, 1990; RAKSHIT e SHENOY, 2017; DADASHI *et al.*, 2020). Sua ação se dá por meio da inibição da enzima isoleucil-tRNA sintetase, bloqueando a incorporação de isoleucina na síntese proteica bacteriana, resultando na inibição da produção de proteínas essenciais para a sobrevivência da bactéria (PAPPA, 1990; RAKSHIT e SHENOY, 2017).

Esse agente apresenta excelente atividade contra bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, e contra alguns organismos Gram-negativos, incluindo *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* (PAPPA, 1990; RAKSHIT E SHENOY, 2017). A mupirocina é amplamente utilizada como agente de descolonização nasal, especialmente em pacientes hospitalizados ou em unidades de terapia intensiva, em que o risco de infecção por *S. aureus* é elevado (PORTAIS *et al.*, 2024). Embora seja considerada segura, a mupirocina pode causar efeitos colaterais leves, como irritação local, prurido e ardência (ERWIN; CHEN, 2024). Protocolos comuns recomendam a aplicação tópica nas narinas anteriores duas vezes ao dia por cinco dias para descolonização nasal, especialmente em pacientes de alto risco, como aqueles em hemodiálise ou no pré-operatório (RAKSHIT e SHENOY, 2017; SEPTIMUS *et al.*, 2016). No entanto, o uso repetido ou indiscriminado pode levar ao desenvolvimento de resistência, com cepas de *S. aureus* exibindo resistência de baixo e alto nível, associadas a mutações cromossômicas ou à presença do gene plasmidial *mupA* (RAKSHIT e SHENOY, 2017; DADASHI *et al.*, 2020). Assim, uma terapia alternativa seria interessante para a eliminação de *S. aureus* das cavidades nasais. Diante das limitações da mupirocina e do risco de resistência, as terapias locais não antibióticas, como a aPDT, surgem como alternativas relevantes.

1.3.TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (APDT) E SUA APLICAÇÃO NO STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Dentre as terapias alternativas, a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT, do inglês *Antimicrobial Photodynamic Therapy*) destaca-se como uma solução inovadora para o tratamento de infecções bacterianas, especialmente aquelas causadas por patógenos resistentes, como *S. aureus*. Essa técnica envolve a ativação fotoquímica de um fotossensibilizador pela luz, promovendo sua transição do estado fundamental para o estado excitado singlete e, posteriormente, para o estado tripleto, que, na presença de oxigênio molecular, possibilita reações fotoquímicas responsáveis pela geração de espécies reativas capazes de inativar microrganismos. Com o aumento da resistência antimicrobiana, a aPDT surge como uma alternativa eficaz no combate a infecções difíceis de tratar (SANTOS *et al.*, 2022).

As espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os radicais hidroxila ($OH\bullet$), o oxigênio singlete (1O_2) e o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), são produtos endógenos gerados pelos leucócitos. Essas espécies são altamente reativas e tóxicas para as células bacterianas, causando danos irreversíveis a componentes celulares essenciais, como membranas, proteínas e ácidos nucleicos (HAMBLIN; HASAN, 2004). A produção excessiva de ROS provoca danos ao DNA, aos lipídeos e às proteínas dos microrganismos, comprometendo sua viabilidade (HAMBLIN; HASAN, 2004).

Os fotossensibilizadores (FS) absorvem luz em uma faixa específica de comprimentos de onda (YUDAEV *et al.*, 2025). Diversas classes de moléculas podem ser utilizadas como FS para a aPDT, sendo as mais comuns as porfirinas, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas e fenotiazinas (ALLAMYRADOV *et al.*, 2024).

Os FS antimicrobianos mais eficazes apresentam carga positiva (catiônica), o que lhes permite interagir preferencialmente com as membranas celulares microbianas, que possuem carga negativa (aniônica) (MELLER *et al.*, 2020). O azul de metileno, um FS aprovado pela ANVISA para uso clínico, pertence à classe das fenotiazinas. Essa molécula aromática heterocíclica catiônica é amplamente utilizada como fotossensibilizador em aPDT (SILVA *et al.*, 2017). O azul de metileno (AM), uma fenotiazina catiônica, é amplamente reconhecido por sua eficiência na

geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e por sua capacidade de promover danos seletivos em organelas intracelulares, como mitocôndrias e lisossomos. Essa característica aumenta sua eficácia tanto em contextos antimicrobianos quanto em terapias fotodinâmicas para câncer (MARTINS *et al.*, 2019; ANCELY *et al.*, 2017)

O AM acumula-se preferencialmente em mitocôndrias e lisossomos, onde sua ativação pela luz resulta em disfunções estruturais e metabólicas que culminam na morte celular. Estudos demonstraram que essa interação organela-específica intensifica os efeitos terapêuticos da aPDT, como observado em bactérias e células tumorais resistentes (MARTINS *et al.*, 2019; TURCHIELLO *et al.*, 2021)

Além disso, o uso de AM em infecções bacterianas, especialmente em cepas resistentes de *S. aureus*, mostrou resultados promissores. Estudos destacam a eficácia do AM em biofilmes bacterianos, reduzindo significativamente a viabilidade celular e promovendo a desestruturação do biofilme (ANCELY *et al.*, 2017; TURCHIELLO *et al.*, 2021)

Apesar de sua reconhecida eficácia, o azul de metileno pode apresentar resultados indesejados quando utilizado em concentrações elevadas ou associado a parâmetros de irradiação inadequados, uma vez que a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode ocorrer de forma pouco seletiva, atingindo não apenas microrganismos, mas também células e tecidos do hospedeiro. Nesse contexto, estudos demonstram que a aplicação de protocolos subótimos pode resultar em efeitos citotóxicos em células não-alvo, reforçando a necessidade de otimização dos parâmetros de tratamento para minimizar efeitos adversos e maximizar a seletividade terapêutica (MARTINS *et al.*, 2019; ANCELY *et al.*, 2017; SERRAGE *et al.*, 2020)

A aPDT tem várias vantagens sobre os antibióticos convencionais: 1- amplo espectro de ação - o fotossensibilizador pode atuar sobre bactérias, fungos, leveduras e parasitas (ALLAMYRADOV *et al.*, 2024); 2- excelente eficácia bactericida - tanto em cepas bacterianas sensíveis quanto em cepas resistentes aos antibióticos convencionais- as cepas bacterianas resistentes, como MRSA, demonstram ser tão suscetíveis a ação da luz e do FS quanto as cepas selvagens (MELLER *et al.*, 2020, STREET *et al.*, 2009, JORI *et al.*, 2006); 3- ação seletiva - a aPDT tem uma ação mais seletiva às células bacterianas, sem causar danos as células do hospedeiro - a coloração seletiva dos componentes da parede celular

bacteriana (por exemplo, lipopolissacarídeos-LPS e peptidoglicano) pelos FS catiônicos, decorrente da interação destes polícatíons com os locais de ligação de cátions divalentes em LPS da superfície celular, proporciona uma maior ligação do FS à parede celular das bactérias do que das células hospedeiras eucarióticas (STREET *et al.*, 2009, HAMBLIN; HASAN, 2004); 4 - efeito localizado - o curto tempo de meia-vida (nanossegundos) do oxigênio singlete, faz com que a migração deste a partir do seu local de formação ocorra de forma extremamente limitada (MELLER *et al.*, 2020, STREET *et al.*, 2009); 5 - ausência de seleção de resistência bacteriana - as fotorreações geradas após a absorção da luz pelos FS provocam a morte inespecífica das células microbianas, em diferentes vias metabólicas, principalmente via peroxidação lipídica e danos à membrana, desta forma, apresentam um mecanismo bactericida inespecífico, não acarretando resistência bacteriana (STREET *et al.*, 2009, HAMBLIN; HASAN, 2004, JORI *et al.*, 2006); 6 - baixo custo - possibilidade de utilizar fontes de luz de baixo custo para ativação do agente fotossensibilizador (JORI *et al.*, 2006).

1.4. MECANISMOS DE AÇÃO NO *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

A eficácia da aPDT no combate ao *S. aureus* decorre de sua capacidade de causar danos letais à célula bacteriana, sem necessidade de atingir um alvo específico, como ocorre com os antibióticos. Esse fato é particularmente relevante no contexto da resistência antimicrobiana, pois o *S. aureus* não possui mecanismos conhecidos para neutralizar os efeitos das espécies reativas de oxigênio geradas durante a terapia (SOARES *et al.*, 2024).

Quanto à aplicação clínica da aPDT na descolonização nasal por *S. aureus*, Street *et al.* (2009) investigaram o uso da terapia em um modelo *in vitro* que simula a cavidade nasal. O estudo avaliou diferentes combinações de parâmetros, como a concentração de azul de metileno, a densidade de potência do laser e o tempo total de irradiação. Os autores observaram que a redução mais expressiva da carga bacteriana ocorreu quando a aPDT foi associada à clorexidina, enquanto a aPDT isolada também promoveu diminuições relevantes, mas não a eliminação completa do MRSA. A combinação considerada mais eficaz pelos autores utilizou azul de

metileno a 0,01%, ativado por 240 segundos (quatro ciclos de 60 segundos), com laser de 670 nm a 400 mW/cm².

Um outro estudo, SCHREINER *et al.* (2018), avaliou a inativação fotodinâmica de diversas espécies bacterianas, com foco na descolonização de MRSA da pele. Utilizando um novo fotossensibilizador, SAPYR [cloreto de 2-((4-piridinil)metil)-1H-fenalen-1-ona], a pesquisa foi realizada, primeiramente, *in vitro* contra várias espécies bacterianas e, posteriormente, em amostras de pele suína *ex vivo*, para avaliar sua segurança e eficácia. O número de bactérias viáveis foi quantificado, e a atividade mitocondrial das células da pele foi avaliada histologicamente com o uso de cloreto de tetrazólio (NBTC). O mesmo protocolo foi utilizado em pele humana para descolonização de MRSA. Os resultados *in vitro* demonstraram uma redução de 5 log10 em todas as espécies bacterianas testadas, enquanto, em pele humana *ex vivo*, a redução foi de 4 log10 no número de MRSA viáveis. Além disso, a coloração de NBTC indicou atividade mitocondrial normal nas células da pele após a terapia. Os autores concluíram que a descolonização de MRSA na pele humana por meio da terapia fotodinâmica mostrou-se altamente eficaz, e os achados deste estudo abrem caminho para futuras investigações clínicas.

Em um estudo recente, avaliamos o efeito da aPDT com azul de metileno a 0,01% em pacientes com *S. aureus* submetidos a tratamento para doença renal crônica. Os resultados demonstraram que a aPDT foi altamente eficaz na descolonização da bactéria, apresentando resultados comparáveis aos obtidos com a mupirocina (BEZERRA, 2021).

No entanto, o protocolo empregado apresentou limitações importantes do ponto de vista operacional, uma vez que demandava aproximadamente 30 minutos da equipe de enfermagem por paciente, o que compromete sua viabilidade na rotina hospitalar.

No referido protocolo, o fotossensibilizador era aplicado por meio de algodão esterilizado, preparado individualmente para cada narina e embebido em azul de metileno a 0,01% no momento da aplicação. O algodão era inserido na porção anterior da cavidade nasal, com tempo de pré-irradiação de 10 minutos por narina, realizados de forma sequencial. A aplicação concomitante nas duas narinas não era adotada devido ao potencial desconforto ao paciente, tornando o procedimento mais demorado e operacionalmente complexo.

A continuidade dessa pesquisa tem potencial para oferecer um tratamento mais confortável e prático, com um protocolo operacional simplificado, o que viabilizaria sua implementação em programas de saúde pública no futuro.

Por esses motivos, foram testados protocolos de aplicação de azul de metileno em várias concentrações e formulações para otimizar o protocolo antimicrobiano e poder aplicar clinicamente e ser viável para aplicação prática para a equipe de enfermagem. Foram realizados experimentos em cultura planctônica.

As culturas planctônicas de *S. aureus* consistem em células bacterianas livres e flutuantes, são geralmente mais suscetíveis à aPDT em comparação com os biofilmes. Estudos indicam que o uso de azul de metileno como fotossensibilizador, quando ativado por luz de comprimento de onda adequado, consegue inativar com sucesso células de *S. aureus* em estado planctônico. Isso ocorre porque, nesse estado, as células estão completamente acessíveis ao fotossensibilizador, o que facilita a absorção do agente e maximiza a geração de ROS, resultando em uma resposta terapêutica mais eficaz (PÉREZ-LAGUNA *et al.*, 2020). Assim, as culturas planctônicas costumam ser mais vulneráveis à aPDT do que outras formas de crescimento bacteriano, como os biofilmes.

Os biofilmes de *S. aureus* representam um desafio maior para a aPDT. Biofilmes são comunidades de bactérias envolvidas em uma matriz protetora de componentes extracelulares, que atua como um escudo, dificultando a penetração do fotossensibilizador e reduzindo a ação das ROS geradas durante a terapia (JIA *et al.*, 2019).

Apesar disso, a aPDT também tem mostrado potencial para combater biofilmes, mas sua eficácia geralmente é reduzida devido à barreira física criada pelo biofilme. Isso acontece porque as células nas camadas mais profundas do biofilme acabam ficando menos expostas ao fotossensibilizador e à luz. Por essa razão, a distribuição do fotossensibilizador é desigual e a geração de ROS não é suficiente para eliminar todas as bactérias presentes nas camadas internas (MONTEIRO *et al.*, 2020). Contudo, com ajustes nos parâmetros de aplicação, como aumentar a concentração de fotossensibilizador ou o tempo de pré-irradiação, é possível melhorar a penetração da terapia e, consequentemente, aumentar a eficiência do tratamento contra biofilmes (PÉREZ-LAGUNA *et al.*, 2020).

A diferença fundamental entre a eficácia da aPDT em culturas planctônicas e em biofilmes reside na organização dessas células. No caso das culturas planctônicas, as células estão livres e sem proteção adicional, o que permite que o fotossensibilizador e a luz atuem de forma mais direta e eficiente. Em contrapartida, nos biofilmes, as células estão envolvidas na matriz protetora, o que impede que a terapia atinja todas as bactérias de forma uniforme (JIA *et al.*, 2019).

Por isso, em culturas planctônicas, os resultados da aPDT geralmente são mais eficazes, com maior eliminação de células bacterianas. Já em biofilmes, apesar dos desafios, a aPDT continua sendo uma alternativa promissora, desde que o protocolo seja ajustado para melhorar a penetração e a distribuição do fotossensibilizador (MONTEIRO *et al.*, 2020; MUEHLER *et al.*, 2022). A aPDT exerce uma ação local eficiente, com baixa probabilidade de induzir resistência bacteriana, o que a diferencia significativamente dos antibióticos tradicionais. No entanto, apesar dos resultados positivos, ainda há desafios a serem superados. O protocolo utilizado na aPDT precisa ser ajustado para garantir que essa técnica seja aplicada de forma segura e eficaz na prática clínica. Esses ajustes são essenciais para transformar a aPDT em uma realidade acessível e aplicável no dia a dia.

1.5. AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA EM CÉLULAS

A aPDT é amplamente conhecida por seu efeito direto sobre microrganismos, mas, na prática clínica, ela não interage apenas com bactérias. Sempre que o fotossensibilizador é aplicado em um tecido, as células do hospedeiro também entram em contato com essa substância e com a energia luminosa necessária para ativá-la. Por isso, além de entender como a aPDT atua sobre o *S. aureus*, é essencial compreender como as células eucarióticas respondem a esse tipo de tratamento, garantindo que o protocolo seja eficaz, mas também seguro e tolerável para o paciente (TANU *et al.*, 2025).

De maneira geral, o mecanismo de ação da aPDT em células eucarióticas começa com a absorção da luz pelo fotossensibilizador. A partir desse momento, a molécula ativada passa a gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), compostos altamente reativos capazes de danificar estruturas celulares importantes. Essas EROs não percorrem longas distâncias dentro do tecido e tendem a agir

exatamente onde são formadas. Isso significa que o local onde o fotossensibilizador se acumula determina quais organelas ou estruturas serão atingidas (WANG; XU; YU, 2021).

Alguns estudos mostram que muitos fotossensibilizadores, incluindo o azul de metileno, tendem a se concentrar com maior afinidade em mitocôndrias. Quando isso acontece, as EROs formadas podem danificar a membrana mitocondrial, levando à perda do seu potencial elétrico e ativando vias de apoptose, que é um tipo de morte celular mais controlada e organizada (PETRELLIS *et al.*, 2019). Em outras situações, o fotossensibilizador se acumula nos lisossomos, organelas responsáveis pela degradação celular, e, nesses casos, a formação de EROs pode provocar o rompimento da membrana lisossomal e a liberação de enzimas no citoplasma, desencadeando processos de estresse e morte celular (MROZ *et al.*, 2011).

Esse comportamento variável indica que a aPDT não é um processo único ou previsível. Dependendo da dose utilizada, da fórmula do fotossensibilizador e do tipo de célula envolvida, diferentes vias de morte celular podem ser ativadas. Nos últimos anos, novas pesquisas ampliaram esse entendimento, demonstrando que, além da apoptose e da necrose, outras formas de morte celular, como a ferroptose e a necroptose, também podem ser ativadas quando o nível de estresse oxidativo é muito elevado (ZHU *et al.*, 2019). A ferroptose, por exemplo, envolve acúmulo de dano oxidativo nos lipídios da membrana, enquanto a necroptose está associada à ativação de proteínas específicas ligadas à resposta inflamatória (CHEN *et al.*, 2024).

Apesar dessa variedade de respostas, a aPDT apresenta uma característica muito importante: a seletividade. Em condições adequadas, ela tende a afetar mais fortemente as bactérias do que as células humanas. Isso ocorre porque muitos fotossensibilizadores são moléculas catiônicas, ou seja, com carga positiva, o que facilita sua ligação às superfícies bacterianas, geralmente com carga negativa. Já as células humanas possuem membranas com composições distintas, o que reduz a afinidade dessas moléculas. Além disso, a luz pode ser aplicada de forma direcionada, o que aumenta ainda mais essa seletividade (BENOV *et al.*, 2014; AMORIM *et al.*, 2024).

Estudos recentes reforçam essa ideia, mostrando que é possível atingir reduções significativas de patógenos, inclusive de cepas resistentes, sem

comprometer a viabilidade das células de mamíferos (PUCELIK *et al.*, 2024; SHOJAEIAN, 2024). Essa diferença entre os efeitos sobre bactérias e células eucarióticas abre espaço para protocolos clínicos mais seguros, desde que haja controle rigoroso da dosimetria usada, tanto do tempo e da potência da luz quanto da concentração do fotossensibilizador.

No entanto, se esses parâmetros ultrapassarem certos limites, começam a aparecer sinais de citotoxicidade. Em fibroblastos, por exemplo, concentrações elevadas de azul de metileno associadas a exposições mais longas à luz resultaram na diminuição da atividade metabólica celular e em mudanças morfológicas, como retração, arredondamento e perda de aderência (LAMARQUE *et al.*, 2020). Em ensaios com células L929, resultados semelhantes foram observados com outros fotossensibilizadores, o que indica que esses efeitos não dependem apenas do tipo de molécula, mas também da energia luminosa aplicada (RIBEIRO *et al.*, 2010; CHANG *et al.*, 2023). Isso reforça a importância de estabelecer limites seguros para que o tecido humano não seja prejudicado.

Para avaliar se o protocolo utilizado está dentro de uma faixa segura, diferentes testes laboratoriais podem ser realizados. O ensaio de MTT, por exemplo, mede a atividade mitocondrial das células e ajuda a identificar se a exposição ao fotossensibilizador e à luz reduziu a capacidade metabólica das células. Já a coloração com Cristal Violeta permite observar se houve perda da aderência celular ou redução da densidade da monocamada, o que indica possíveis danos à estrutura celular. Esses ensaios são utilizados porque fornecem uma visão clara tanto da viabilidade quanto da integridade das células após a aPDT (CARREÑO *et al.*, 202). Além deles, o método de Griess é usado para avaliar a produção de óxido nítrico (NO), um marcador relacionado ao estresse oxidativo, permitindo verificar se o tratamento desencadeou processos inflamatórios ou um desequilíbrio redox.

No caso da mucosa nasal, essa avaliação torna-se ainda mais importante. Estamos lidando com uma região sensível, constantemente exposta a fatores externos e que desempenha funções fisiológicas essenciais. Um protocolo que elimine o *S. aureus*, mas cause dano tecidual, não seria viável clinicamente. Portanto, a inclusão das análises com fibroblastos L929 no presente estudo não é apenas complementar, mas também fundamental. Esses testes permitem identificar se os parâmetros de azul de metileno e de iluminação selecionados são capazes

de controlar a carga bacteriana sem causar prejuízos significativos às células humanas.

Assim, compreender a ação da aPDT em células contribui diretamente para o desenvolvimento de um protocolo seguro, eficaz e aplicável à prática clínica. Além de complementar os resultados microbiológicos obtidos em cultura planctônica, essa avaliação ajuda a definir uma faixa terapêutica adequada e fornece a base necessária para considerar, no futuro, o uso da aPDT como alternativa para a descolonização nasal de pacientes, especialmente de indivíduos em tratamento dialítico.

2. JUSTIFICATIVA

O *S. aureus* é um patógeno oportunista associado a infecções graves e de difícil manejo, sobretudo em ambientes hospitalares, devido à sua capacidade de colonizar pele e mucosas e desenvolver resistência a antimicrobianos (OGSTON, 1984; LOWY, 1998; IOANNOU *et al.*, 2023). A colonização nasal — presente em cerca de 30% da população — aumenta significativamente o risco de infecções invasivas, especialmente em imunocomprometidos e em pacientes submetidos a procedimentos como hemodiálise (KRISMER *et al.*, 2017; LAUX *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2020; MANDOLFO *et al.*, 2025). Nessas populações, a colonização está associada a maior incidência de bacteremia, sepse e mortalidade (HERWALDT *et al.*, 1998; CHOW *et al.*, 1989; BITUNGURAMYE *et al.*, 2024).

Embora a mupirocina seja o principal agente para a descolonização nasal, o surgimento crescente de resistência limita sua aplicação contínua (PAPPA, 1990; RAKSHIT; SHENOY, 2017; DADASHI *et al.*, 2020). Assim, torna-se essencial o desenvolvimento de estratégias não antibióticas que reduzam a carga microbiana sem induzir resistência (MOHAMMAD *et al.*, 2025; PIEWNGAM; OTTO, 2024).

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT) surge como alternativa promissora, pois gera espécies reativas de oxigênio capazes de inativar microrganismos sem selecionar bactérias resistentes (HAMBLIN; HASAN, 2004; JORI *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2024). O azul de metileno, amplamente estudado, apresenta alta afinidade por bactérias e eficácia comprovada contra *S. aureus*, incluindo biofilmes e cepas resistentes (SILVA *et al.*, 2017; TURCHIELLO *et al.*, 2021; PÉREZ-LAGUNA *et al.*, 2020). Estudos prévios indicam resultados promissores na descolonização nasal e cutânea (STREET *et al.*, 2009; SCHREINER *et al.*, 2018; BEZERRA, 2021).

No entanto, ainda há inconsistências importantes nos parâmetros de aplicação — concentração, formulação, dose de luz e tempo de pré-irradiação — que dificultam a padronização clínica (MARTINS *et al.*, 2019; SERRAGE *et al.*, 2020; ALLAMYRADOV *et al.*, 2024) das formulações utilizadas clinicamente. Além disso, a formulação líquida apresenta limitações práticas para aplicação tópica em mucosas, como menor retenção no local de interesse, possível escoamento e variabilidade na distribuição do fotossensibilizador, fatores que podem comprometer tanto a eficácia quanto a reprodutibilidade clínica do protocolo. Paralelamente,

estudos realizados com fibroblastos indicam que determinadas combinações entre concentração do fotossensibilizador e dosimetria luminosa podem resultar em citotoxicidade, reforçando a necessidade de avaliar simultaneamente a eficácia antimicrobiana e a segurança celular do protocolo proposto (RIBEIRO *et al.*, 2010; LAMARQUE *et al.*, 2020; CHANG *et al.*, 2023).

Nesse contexto, justifica-se a realização de um estudo que otimize e compare diferentes formulações do azul de metileno — líquida e em gel — e distintos tempos de pré-irradiação na aPDT contra *S. aureus* em cultura planctônica, associando a análise antimicrobiana à avaliação da citotoxicidade, viabilidade e resposta celular em fibroblastos L929. Essa abordagem permite não apenas investigar a eficácia da terapia, mas também verificar se modificações na formulação e nos parâmetros de aplicação podem contribuir para maior segurança, melhor controle da aplicação tópica e maior viabilidade para futura utilização clínica.

3. OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Avaliar um protocolo otimizado de terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) para a descolonização de *S. aureus*, comparando diferentes formulações e tempos de pré-irradiação do azul de metileno, e avaliar a citotoxicidade, a biocompatibilidade e a resposta celular das formulações selecionadas em linhagem de fibroblastos L929.

Objetivos Específicos

- Estabelecer e padronizar a curva de crescimento de *S. aureus* (ATCC 6538), por meio da construção da curva de crescimento, determinação do tempo necessário para alcançar a fase exponencial (mid-log), ajuste da densidade óptica (DO_{600nm}) e quantificação de UFC/mL, garantindo reprodutibilidade e controle da carga microbiana utilizada nos ensaios de aPDT.
- Comparar a eficácia antimicrobiana do azul de metileno em gel (0,01%) e em solução aquosa (0,01% e 0,005%) em culturas planctônicas de *S. aureus* (ATCC 6538) na fase exponencial de crescimento, submetidas ao protocolo otimizado de aPDT, por meio da quantificação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).
- Avaliar o impacto da redução do tempo de pré-irradiação do azul de metileno (5 e 3 minutos) na eficácia antimicrobiana da aPDT otimizada em *S. aureus* (ATCC 6538), por meio da quantificação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).
- Determinar, pelo ensaio MTT, a viabilidade e a atividade metabólica de fibroblastos L929 após 24 e 48 horas de exposição às formulações líquidas de azul de metileno (0,005% e 0,01%), nas condições do protocolo otimizado de aPDT.
- Verificar, pelo ensaio de Cristal Violeta, a integridade e a densidade da monocamada da linhagem fibroblástica L929 após 24 e 48 horas de exposição às formulações líquidas de azul de metileno, conforme o protocolo otimizado de aPDT.

- Quantificar, pelo Griess Test, a produção de nitrito (NO_2^-) nas culturas de L929 após 24 e 48 horas de exposição às formulações líquidas de azul de metileno, segundo o protocolo otimizado, e avaliar a possível indução de estresse oxidativo ou inflamatório.

4. METODOLOGIA

4.1. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS DE CRESCIMENTO, PADRONIZAÇÃO E INATIVAÇÃO BACTERIANA POR APDT

4.1.1. Cepa bacteriana e curva de crescimento

Inicialmente, *S. aureus* (ATCC 6538), armazenada em freezer a -80°C, foi descongelada e semeada em placas de ágar *Brain Heart Infusion* (BHI; Kasvi, São Paulo, Brasil), incubada em estufa a 37 °C por 48 horas. Em seguida, uma colônia isolada foi selecionada, transferida para 7 mL de caldo cérebro coração (BHI – *brain heart infusion*) e incubada por 16 horas (overnight) a 37 °C.

Após 24h, a cultura foi ajustada para uma densidade óptica (DO) de 1,0 a 600 nm (DO₆₀₀ nm), utilizando um espectrofotômetro (Femto 700 Plus®, São Paulo, Brasil). Posteriormente, realizou-se uma diluição de 1:40 (1 mL da cultura bacteriana em 39 mL de caldo BHI), e a suspensão resultante foi incubada a 37 °C por 9 horas em tubos Falcon de 50 mL (Kasvi, China). Durante esse período, as leituras de DO₆₀₀ nm foram realizadas a cada 1 hora. Todo o procedimento foi repetido duas vezes para garantir a reprodutibilidade.

Após identificar o tempo correspondente à fase exponencial de crescimento, procedeu-se à contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) por meio de diluições seriadas (1:10) em solução tampão salina fosfatada 1× (PBS), seguidas de plaqueamento em ágar BHI e incubação a 37 °C por 48 horas. O número de UFC/mL foi calculado segundo a fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{número de colônias} \times \text{fator de diluição}}{\text{volume plaqueado (mL)}}$$

4.2. ANÁLISE COMPARATIVA DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES DE AZUL DE METILENO E DOS TEMPOS DE PRÉ-IRRADIAÇÃO NO DESEMPENHO DA aPDT EM *Staphylococcus aureus*

4.2.1. Desenho experimental

O tratamento com terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) foi realizado *in vitro*, utilizando culturas planctônicas de *S. aureus* na fase exponencial do

crescimento. Os experimentos foram organizados em grupos controle e grupos experimentais, conforme descrito a seguir:

Grupo	<i>S.aureus</i>	AM solução 0,005%	AM solução 0,01%	AM gel 0,01%	Pré- irradiação 3 min	Pré- irradiação 5 min	Laser 660 nm (5 min)
Controle	X	–	–	–	–	–	–
Laser	X	–	–	–	–	–	X
AM 0,005% – 3 min	X	X	–	–	X	–	–
AM 0,005% – 5 min	X	X	–	–	–	X	–
AM 0,01% – 3 min	X	–	X	–	X	–	–
AM 0,01% – 5 min	X	–	X	–	–	X	–
L + AM 0,005% – 3 min	X	X	–	–	X	–	X
L + AM 0,005% – 5 min	X	X	–	–	–	X	X
L + AM 0,01% – 3 min	X	–	X	–	X	–	X
L + AM 0,01% – 5 min	X	–	X	–	–	X	X
AM gel 0,01% – 3 min	X	–	–	X	X	–	
L + AM gel 0,01% – 3 min	X	–	–	X	X	–	X
AM gel 0,01% – 5 min	X	–	–	X	–	X	–
L + AM gel 0,01% – 5 min	X	–	–	X	–	X	X

TABELA 1 - Delineamento experimental dos grupos de aPDT em *S. aureus*

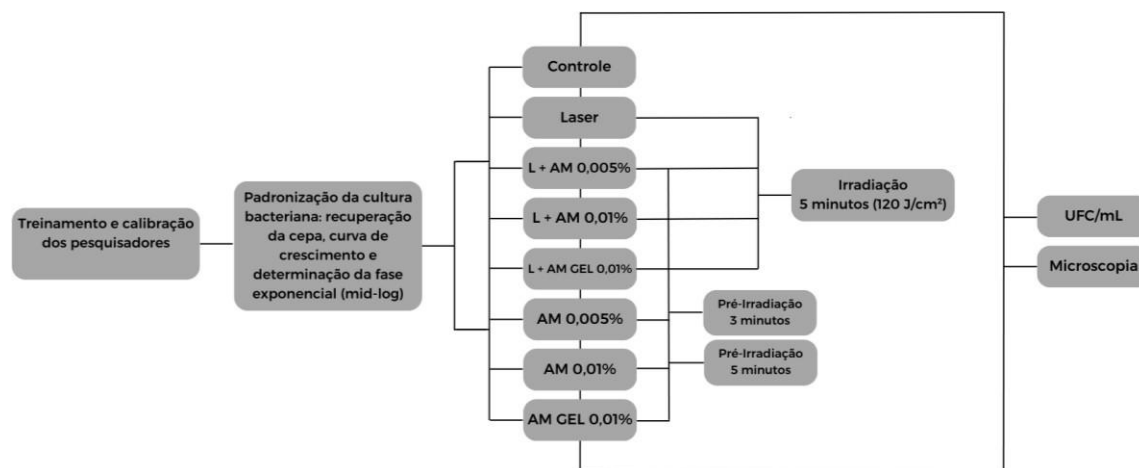


FIGURA 1 - Fluxograma do delineamento experimental dos ensaios de aPDT em *S. aureus*

4.3. TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

4.3.1. Protótipo *Laser* (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*)

Foi utilizado o protótipo de laser desenvolvido pela empresa ECCOFIBRAS (Brasil, Figura 2), equipado com duas saídas de irradiação, concebido para futura aplicação em estudos clínicos nas cavidades nasais. Os parâmetros operacionais estão descritos na Tabela 2.



FIGURA 2 - Protótipo do equipamento laser utilizado no estudo

PARÂMETROS DOSIMÉTRICOS	
Comprimento de onda [nm]	660
Modo de funcionamento	Contínuo
Potência [mW]	400 mW
Tempo de exposição [s]	5 minutos
Irradiância [mW/cm ²]	400 mW/cm ²
Exposição radiante [J/cm ²]	120 J/cm ²
Energia radiante [J]	120 J
Número de pontos irradiados	Único ponto
Técnica de aplicação	Iluminação uniforme
Número de sessões e frequência	Sessão única
Fotosensibilizador	Azul de metileno líquido (0,01% e 0,005%) e gel (0,01%) (Chimiolux 1, DMC)
Tempo de pré irradiação	3 ou 5 minutos

TABELA 2 - Parâmetros dosimétricos do protótipo de laser a 660 nm empregado nos ensaios de aPDT

4.4. ATIVIDADE DA aPDT EM CULTURA DE *S. AUREUS* PLANCTÔNICOS

As bactérias foram ajustadas para a concentração final de 1×10^8 UFC/mL por amostra (CHAKRABORTY *et al.*, 2024). Em seguida, alíquotas de 100 µL da suspensão bacteriana foram transferidas para tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL, e as células bacterianas foram centrifugadas a 10.000 rpm, a 4 °C, por 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado. O pellet resultante foi ressuspensão em 100 µL de azul de metileno (AM) nas formulações gel 0,01% ou líquido 0,01% ou 0,005%, seguido de incubação no escuro por 5 ou 3 minutos à temperatura ambiente. Nos grupos controle (sem fotossensibilizador), as bactérias foram ressuspensas em 100 µL de tampão PBS 1×.

As irradiações foram realizadas com um equipamento de laser vermelho (λ = 660 nm), operando em modo contínuo por 5 minutos, com irradiância de 400 mW/cm², exposição radiante total de 120 J/cm² e distância aproximada de 3 mm da superfície do líquido contido no tubo Eppendorf (CHAKRABORTY *et al.*, 2024). Após a irradiação, as amostras foram submetidas a diluições seriadas (1:10) em tampão PBS 1× e um volume de 10 µL foi plaqueado em ágar BHI e incubado a 37 °C por 24 horas para a contagem de colônias das bactérias sobreviventes (Herigstad *et al.*, 2001).

O número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) foi determinado pela fórmula:

$$\text{UFC/mL} = (\text{número de colônias} \times \text{fator de diluição}) / \text{volume do plaqueado (mL)}.$$

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com dois ensaios independentes.

4.5. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, VIABILIDADE CELULAR E ESTRESSE OXIDATIVO EM FIBROBLASTOS L929

4.5.1. Desenho experimental

O tratamento com terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) foi realizado *in vitro*, com fibroblastos L929. Os experimentos foram organizados em grupos controle e grupos experimentais, conforme descrito a seguir:

Grupo	Fibroblastos L929	AM solução 0,005%	AM solução 0,01%	Pré-irradiação 3 min	Pré-irradiação 5 min	Laser 660 nm (5 min)
Controle	X	–	–	–	–	–
Laser	X	–	–	–	–	X
AM 0,005% – 3 min	X	X	–	X	–	–
AM 0,005% – 5 min	X	X	–	–	X	–
AM 0,01% – 3 min	X	–	X	X	–	–
AM 0,01% – 5 min	X	–	X	–	X	–
L + AM 0,005% – 3 min	X	X	–	X	–	X
L + AM 0,005% – 5 min	X	X	–	–	X	X
L + AM 0,01% – 3 min	X	–	X	X	–	X
L + AM 0,01% – 5 min	X	–	X	–	X	X

TABELA 3 - Delineamento experimental dos grupos de aPDT em fibroblastos L929

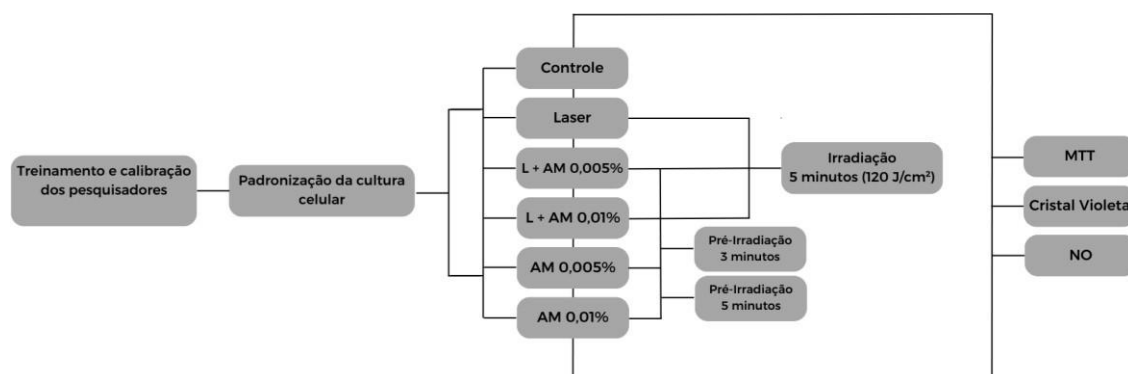


FIGURA 3 - Fluxograma do delineamento experimental dos ensaios de aPDT em fibroblastos L929

4.5.2. Atividade do azul de metileno em fibroblastos L929

Além de comprovar a eficácia antimicrobiana da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT) frente ao *S. aureus*, é fundamental assegurar a segurança biológica do protocolo, sobretudo considerando a perspectiva de aplicação clínica na mucosa nasal. Assim, este estudo incluiu ensaios de citotoxicidade e biocompatibilidade em células fibroblásticas L929, empregando as formulações líquidas de azul de metileno (AM) que apresentaram melhor desempenho antimicrobiano.

Os fibroblastos L929 foram descongelados do freezer a -80°C e cultivados em meio DMEM completo (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Sigma-Aldrich), contendo 10% de soro fetal bovino (NOVABIO) e 5% de solução antibiótica/antimicótica (penicilina, estreptomicina e anfotericina B) em incubadora a 37°C e em atmosfera de 5% de CO_2 (Thermo Electron Corporation), até atingirem confluência.

As garrafas de cultivo foram lavadas com 5 mL de 1x PBS para remover células mortas e resíduos. Em seguida, foram adicionados 4 mL de tripsina, com permanência de 5 min na estufa. Após confirmação microscópica do desprendimento celular, foram adicionados 4 mL de DMEM completo para neutralizar a tripsina. O conteúdo foi transferido para tubos cônicos de 50 mL e centrifugado a 1.200 rpm por 5 min. O precipitado foi ressuspenso em 10 mL de DMEM completo, e a contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer,

empregando 10 µL da suspensão misturados a 10 µL de azul de tripan. A concentração celular foi calculada pela média das contagens $\times 2 \times 10^4$ células/mL.

Cada grupo experimental foi preparado em tubos de centrifuga de 50 mL, recebendo 5×10^4 células em volume final de 100 µL e tratado conforme o delineamento: Controle somente células (ressuspensão em 100 µL de 1xPBS), células com tratamento laser (ressuspensão em 100 µL de 1xPBS), Azul de Metileno (AM) líquido (0,005% e 0,01% em um volume de 100 µL) com ou sem tratamento de laser. Os tubos contendo AM permaneceram no escuro durante o período de pré-irradiação (3 ou 5 min) e, quando aplicável, foram posteriormente irradiados com laser vermelho (660 nm; 400 mW/cm²; 120 J/cm²) por 5 min.

Após os tratamentos, as células foram centrifugadas a 1.200 rpm por 5 min, lavadas com 10 mL de 1xPBS, centrifugadas novamente e ressuspensas em DMEM completo. Em seguida, as células foram distribuídas em 100 µL por poço em placas de 96 poços e incubadas por 24 e 48 horas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37 °C. Depois deste período, foram realizados ensaios de viabilidade, integridade e produção de óxido nítrico.

4.5.3. Ensaio de viabilidade MTT

Para análise da viabilidade celular após o tratamento dos fibroblastos com azul de metileno e a terapia fotodinâmica, utilizamos o ensaio de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide).

Após cada período de incubação, o meio foi removido e os poços foram lavados com 100 µL de 1x PBS. Em seguida, foram adicionados 50 µL da solução de MTT a 0,5 mg/mL em 1x PBS por poço. As placas foram incubadas por 3 h a 37 °C, protegidas da luz. Após este período, foram adicionados 100 µL de álcool isopropílico para solubilizar os cristais de formazan. A leitura da absorbância foi realizada a 620 nm em um leitor de microplacas (Biotek Epoch™). A viabilidade celular foi expressa como porcentagem em relação ao grupo controle.

4.5.4. Ensaio de integridade de monocamada – Cristal Violeta

A análise com Cristal Violeta fornece informações sobre a presença, a distribuição e a integridade da monocamada celular, uma vez que o corante se liga a proteínas e componentes estruturais das células aderidas ao fundo da placa. Após as etapas de lavagem, células que perderam a aderência são removidas,

enquanto as células firmemente aderidas permanecem coradas e visíveis à microscopia óptica. Dessa forma, a redução da área corada, a descontinuidade da monocamada e as alterações morfológicas observadas permitem identificar a perda de aderência celular, complementando os dados obtidos no ensaio de MTT, mesmo em situações em que a atividade metabólica se mantém parcialmente preservada (GAMBACURTA *et al.*, 2025).

As células L929 foram cultivadas, tratadas e distribuídas em placas de 96 poços, conforme descrito no ensaio MTT, e posteriormente incubadas por 24 e 48 horas. Em cada ponto de análise, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com 100 µL de 1x PBS. Em seguida, foram adicionados 50 µL/poço de solução de Cristal Violeta a 0,1% (preparada a partir de solução estoque a 5% em metanol a 20%), mantendo a reação em contato por 15 min à temperatura ambiente.

Após o tempo de incubação, o excesso de corante foi removido por meio de duas lavagens com água destilada e as placas foram deixadas para secar. Em seguida, o corante retido pelas células aderidas à placa foi solubilizado diretamente nos poços com 100 µL de metanol, e a absorbância foi determinada a 590 nm. Os valores obtidos foram comparados aos controles, permitindo identificar possíveis alterações na aderência celular.

A análise microscópica simples das placas também foi realizada para observar visualmente a presença ou ausência de células aderidas após os tratamentos. Essa etapa permitiu confirmar, de forma qualitativa, os achados do ensaio de Cristal Violeta, especialmente quanto à perda de aderência e à redução da densidade celular nos grupos expostos ao azul de metileno associado ao laser.

4.5.5. Quantificação de óxido nítrico – Griess Test

O ensaio de Griess foi empregado para quantificar nitrito (NO_2^-), produto estável do óxido nítrico (NO), a partir dos sobrenadantes das culturas de células L929.

Após 24 e 48 horas de incubação, os sobrenadantes das culturas foram coletados. O reagente de Griess foi preparado no escuro, combinando N-(1-naftil) etilenodiamina dihidroclorato a 0,1% e sulfanilamida a 1% em ácido ortofosfórico a 2,5%, mantendo-se a 2–8 °C até o momento do uso. Uma curva padrão foi obtida por meio de diluições seriadas de uma solução de nitrito de sódio 10 mM.

Em placas de 96 poços, 50 µL de cada amostra, em quadruplicata, foram adicionados a 50 µL do reagente de Griess. Após 10 min de reação à temperatura ambiente, a leitura da absorbância foi realizada a 540 nm, em leitor de microplacas. A concentração de nitrito foi determinada com base na curva padrão, permitindo avaliar a produção de NO e a ocorrência de estresse nitrosativo induzido pelas formulações de AM.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, os dados foram avaliados quanto à distribuição de normalidade. Após a confirmação da distribuição normal, as diferenças entre os grupos experimentais foram analisadas por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5.RESULTADOS

5.1.RESULTADOS DOS ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS DE CRESCIMENTO, PADRONIZAÇÃO E INATIVAÇÃO BACTERIANA POR aPDT

5.1.1. Curva de Crescimento de *Staphylococcus aureus*

Para a padronização experimental, foi estabelecida a curva de crescimento do *S. aureus* (ATCC 6538), utilizando-se de espectrofotometria para mensurar a densidade óptica a 600 nm (OD600) ao longo de 9 horas. Os dados demonstraram que a fase de crescimento exponencial médio (mid-log) ocorre em aproximadamente 5 horas de incubação, com valores de absorbância próximos de 0,7 (Figuras 4), o que foi considerado o ponto ideal para a realização dos experimentos.

TEMPO(H)	ABS (Tubo 1)	ABS (Tubo 2)
0	0,12	0,119
1	0,087	0,084
2	0,156	0,151
3	0,251	0,249
4	0,44	0,46
5	0,741	0,764
6	1,187	1,187
7	1,449	1,463
8	1,548	1,572
9	1,569	1,582

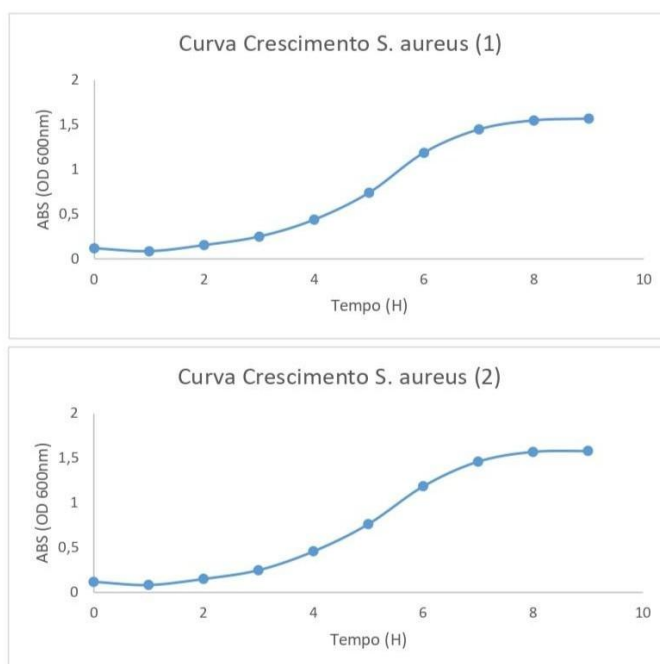


FIGURA 4 - Curva de crescimento de *S. aureus* com leituras de absorbância

5.1.2. Contagem de Colônias

A contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) foi realizada na fase mid-log do crescimento exponencial, ou seja, quando a absorbância estava em

0,7 (OD600nm= 0,7). O valor desta contagem foi considerado para a realização dos experimentos da atividade da aPDT em bactérias planctônicas.

As contagens foram realizadas em dois experimentos independentes, cujos resultados estão apresentados abaixo:

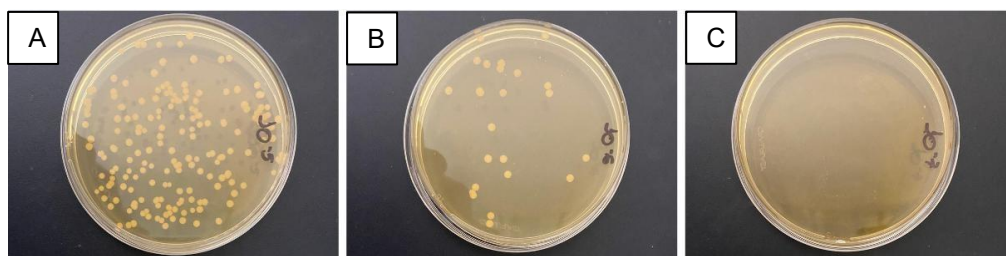


FIGURA 5 - Imagens de placas de cultura após o crescimento de colônias bacterianas de *S aureus* em diferentes diluições do experimento. A) Diluição 10^{-5} ; (B) Diluição 10^{-6} ; (C) Diluição 10^{-7}

Os cálculos foram feitos utilizando a fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de colônias} \times \text{Fator de diluição}}{\text{Volume plaqueado (mL)}}$$

Consideramos a diluição 10^{-6} , pois é onde obtivemos uma contagem entre 20-100 colônias, sendo de uma contagem mais precisa do crescimento.

Experimento	Réplica 1 (nº de colônias)	Réplica 2 (nº de colônias)	Média de colônias	UFC/mL (estimado)
Experimento 1	22	18	20,0	$2,0 \times 10^8$
Experimento 2	13	22	17,5	$1,75 \times 10^8$

TABELA 4 - CONTAGEM DE COLÔNIAS E ESTIMATIVA DE UFC/ML DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Os resultados das contagens de ambos os experimentos foram consistentes, confirmando que na OD600 $\approx 0,7$, a concentração bacteriana é de aproximadamente 2×10^8 UFC/mL.

5.2. RESULTADOS DA ANÁLISE COMPARATIVA DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES DE AZUL DE METILENO E DOS TEMPOS DE PRÉ-IRRADIAÇÃO NO DESEMPENHO DA aPDT EM *Staphylococcus aureus*

5.2.1. Resultados da aPDT com AM 0,005% e 3 ou 5 minutos de pré-irradiação

Após incubação por 24 horas a 37 °C, os grupos Controle (*S. aureus*) e Laser apresentaram crescimento bacteriano elevado, com contagens médias próximas a 10^8 UFC/mL, sem diferença estatisticamente significativa entre si. De forma semelhante, os grupos tratados apenas com azul de metileno a 0,005%, tanto com 3 quanto com 5 minutos de pré-irradiação, mantiveram altos níveis de crescimento bacteriano, com valores na ordem de 10^7 a 10^8 UFC/mL, indicando ausência de efeito antimicrobiano do fotossensibilizador quando utilizado isoladamente.

No grupo submetido à aPDT com AM 0,005% e 3 minutos de pré-irradiação (Laser + AM 0,005% – 3 min), observou-se redução significativa da carga bacteriana em comparação aos grupos Controle, Laser e AM isolado (**** $p < 0,0001$). As contagens médias foram da ordem de 10^4 UFC/mL, evidenciando inativação bacteriana expressiva, porém com crescimento residual detectável em todas as repetições experimentais.

Por outro lado, no grupo tratado com aPDT utilizando AM 0,005% e 5 minutos de pré-irradiação (Laser + AM 0,005% – 5 min), não foi observado crescimento bacteriano nas diluições analisadas, caracterizando inativação completa de *S. aureus*. Esse grupo apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a todos os demais grupos experimentais (**** $p < 0,0001$).

As contagens de UFC/mL foram realizadas por meio de diluições seriadas (1:10), utilizando-se a diluição 10^{-5} como referência para os cálculos. Os dados são apresentados como média e desvio padrão, obtidos a partir de três experimentos independentes.

De forma geral, os resultados demonstram que a eficácia da aPDT com AM 0,005% foi dependente do tempo de pré-irradiação, com inativação parcial após 3 minutos e inativação completa após 5 minutos de incubação no escuro antes da irradiação.

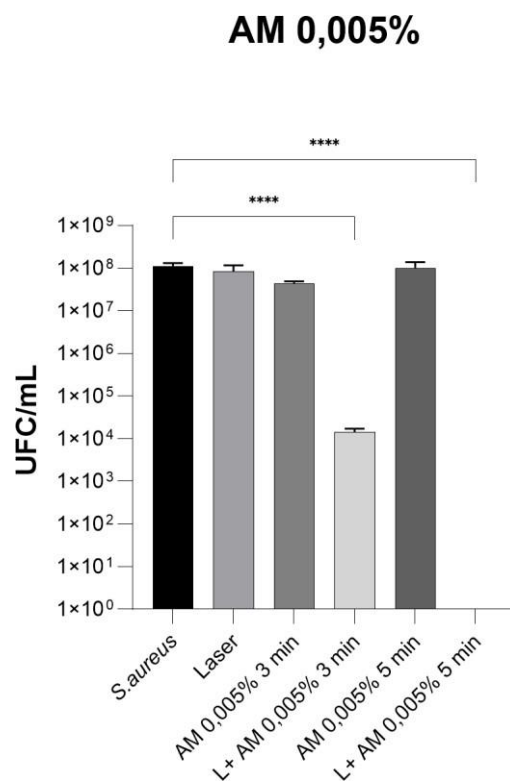


FIGURA 6 - Contagem de UFC/mL após tratamento com AM 0,005% e 3 ou 5 min de pré-irradiação

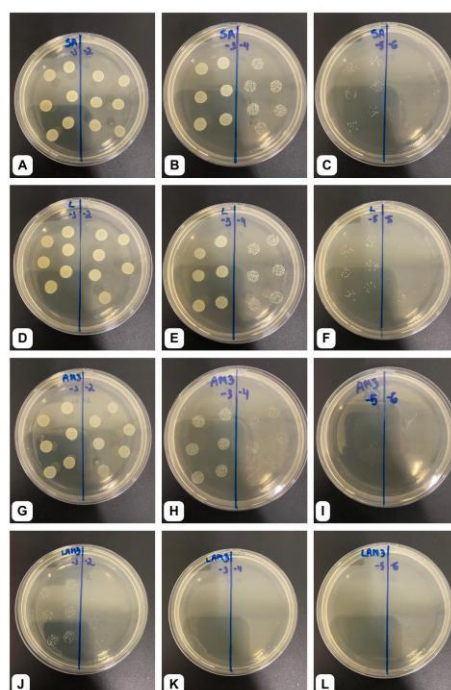


FIGURA 7 - Placas de cultivo bacteriano após tratamentos com AM 0,005% e 3 min de pré-irradiação (A–

C) Grupo Controle (*S. aureus*); (D–F) Grupo Laser. (G–I) Grupo tratado apenas com AM 0,005% com 3 min de pré-irradiação. (J–L) Grupos submetidos à aPDT com AM 0,005% 3 min de pré-irradiação e 5 min de irradiação com laser. Cada placa apresenta duas diluições seriadas, 10^{-1} a 10^{-6} .

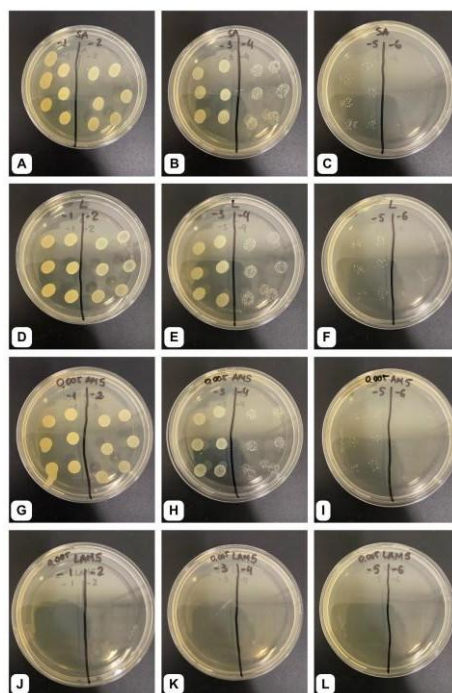


FIGURA 8 - Placas de cultivo bacteriano após tratamentos com AM 0,005% e 5 min de pré-irradiação (A–

C) Grupo Controle (*S. aureus*); (D–F) Grupo Laser. (G–I) Grupo tratado apenas com AM 0,005% com 5 min de pré-irradiação. (J–L) Grupos submetidos à aPDT com AM 0,005% 5 min de pré-irradiação e 5 min de irradiação com laser. Cada placa apresenta duas diluições seriadas, 10^{-1} a 10^{-6} .

5.2.2. Resultados da aPDT com AM 0,01% e 3 ou 5 minutos de pré-irradiação

Após incubação por 24 h a 37 °C, os grupos Controle (*S. aureus*) e Laser apresentaram crescimento bacteriano elevado, com contagens médias na ordem de 10^7 UFC/mL. De forma semelhante, os grupos tratados apenas com azul de metileno a 0,01%, tanto com 3 quanto com 5 minutos de pré-irradiação, mantiveram altos níveis de crescimento bacteriano, com valores variando aproximadamente entre $2,7 \times 10^7$ e $1,6 \times 10^8$ UFC/mL, indicando que o aumento do tempo de pré-irradiação, na ausência do laser, não promoveu redução significativa da viabilidade de *S. aureus*.

No grupo submetido à aPDT com AM 0,01% e 3 minutos de pré-irradiação (Laser + AM 0,01% – 3 min), observou-se redução significativa da carga bacteriana em comparação aos grupos Controle, Laser e AM 0,01% isolado (** $p < 0,01$). As contagens médias situaram-se na ordem de 10^3 a 10^4 UFC/mL, evidenciando diminuição expressiva da viabilidade bacteriana. No entanto, colônias residuais

ainda foram detectadas em todas as repetições experimentais, caracterizando inativação parcial.

Por outro lado, no grupo tratado com aPDT utilizando AM 0,01% e 5 minutos de pré-irradiação (Laser + AM 0,01% – 5 min), não foi observado crescimento bacteriano nas diluições analisadas, indicando inativação completa de *S. aureus*. Esse grupo apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a todos os demais grupos experimentais (** $p < 0,01$). A ausência de colônias foi confirmada pela análise visual das placas em todas as repetições.

As contagens de UFC/mL foram realizadas por meio de diluições seriadas (1:10), utilizando-se a diluição 10^{-5} para o cálculo, e os resultados são apresentados como média e desvio padrão, obtidos a partir de três experimentos independentes.

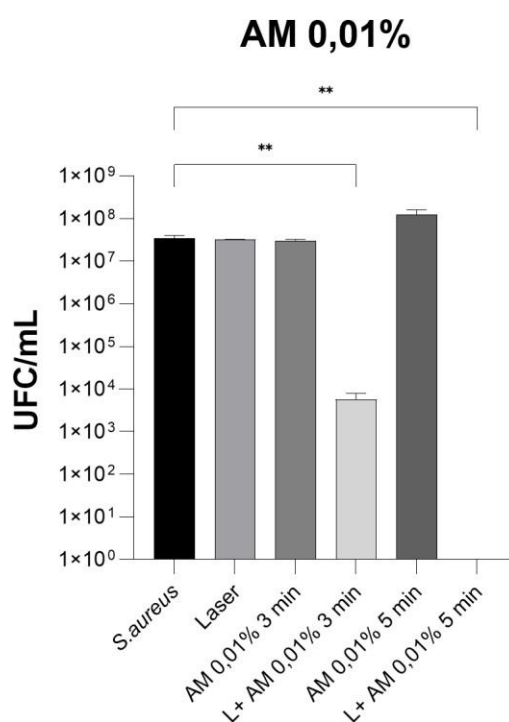


FIGURA 9 - Contagem de UFC/mL após tratamento com AM 0,01% e 3 ou 5 min de pré-irradiação

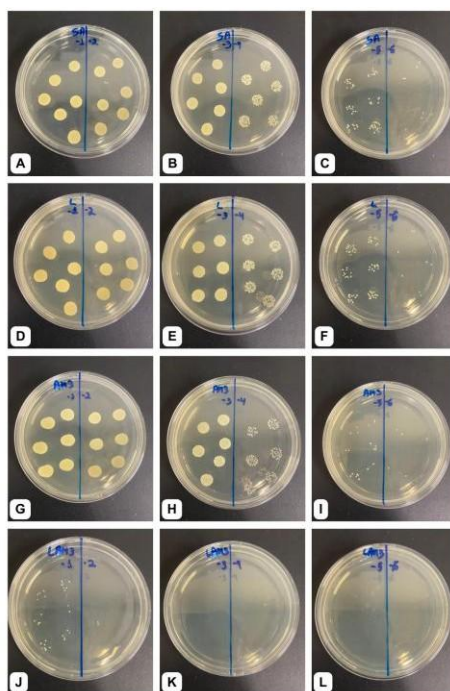


FIGURA 10 - Placas de cultivo bacteriano após tratamentos com AM 0,01% e 3 min de pré-irradiação

(A–C) Grupo Controle (*S. aureus*); (D–F) Grupo Laser. (G–I) Grupo tratado apenas com AM 0,01% com 3 min de pré-irradiação. (J–L) Grupos submetidos à aPDT com AM 0,01% 3 min de pré-irradiação e 5 min de irradiação com laser. Cada placa apresenta duas diluições seriadas, 10^{-1} a 10^{-6} .

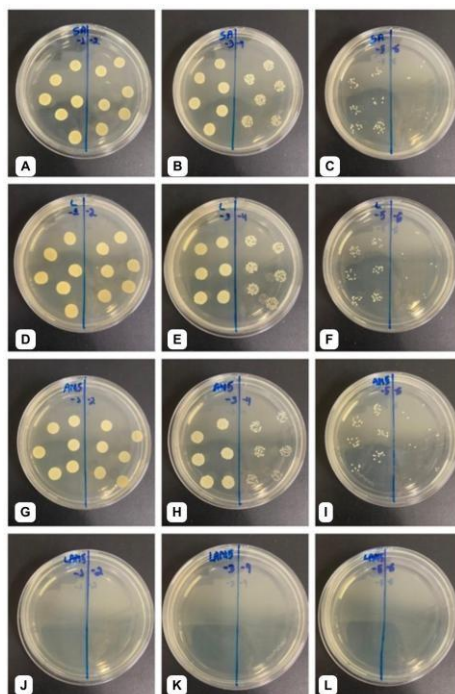


FIGURA 11 - Placas de cultivo bacteriano após tratamentos com AM 0,01% e 5 min de pré-irradiação

(A–C) Grupo Controle (*S. aureus*); (D–F) Grupo Laser. (G–I) Grupo tratado apenas com AM 0,01% com 5 min de pré-irradiação. (J–L) Grupos submetidos à aPDT com AM 0,01% 5 min de pré-irradiação e 5 min de irradiação com laser. Cada placa apresenta duas diluições seriadas, 10^{-1} a 10^{-6} .

5.2.3. Resultados da aPDT com AM Gel 0,01% e 3 minutos de pré-irradiação

Após incubação por 24 h a 37 °C, todos os grupos experimentais apresentaram crescimento bacteriano elevado, com contagens médias variando aproximadamente entre $8,0 \times 10^7$ e $2,6 \times 10^8$ UFC/mL. Os grupos Controle (S. aureus) e Laser exibiram valores semelhantes, indicando que a irradiação isolada não promoveu redução da viabilidade bacteriana.

De forma semelhante, os grupos tratados apenas com azul de metileno em gel a 0,01%, tanto com 3 quanto com 5 minutos de pré-irradiação, mantiveram contagens elevadas de UFC/mL, comparáveis às observadas no grupo controle. Esses resultados indicam que o aumento do tempo de pré-irradiação, na ausência do laser, não interferiu no crescimento bacteriano.

Nos grupos submetidos à aPDT com AM Gel 0,01%, tanto com 3 minutos quanto com 5 minutos de pré-irradiação (Laser + AM Gel 0,01% – 3 min e Laser + AM Gel 0,01% – 5 min), não houve redução da carga bacteriana em relação aos grupos Controle, Laser ou AM Gel isolado (ns). As contagens de UFC/mL permaneceram na ordem de 10^8 UFC/mL em todas as condições avaliadas, sem diferença estatística entre os grupos.

A análise qualitativa das placas de ágar BHI, contendo diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-6} , corroborou os dados quantitativos. Todos os grupos apresentaram crescimento bacteriano abundante e distribuição semelhante de colônias nas diferentes diluições, não sendo observada redução no número de colônias nos grupos tratados com Laser + AM Gel 0,01%, independentemente do tempo de pré-irradiação.

As contagens foram realizadas por meio de diluições seriadas (1:10), utilizando-se a diluição 10^{-5} para o cálculo das UFC/mL. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão, obtidos a partir de três experimentos independentes.

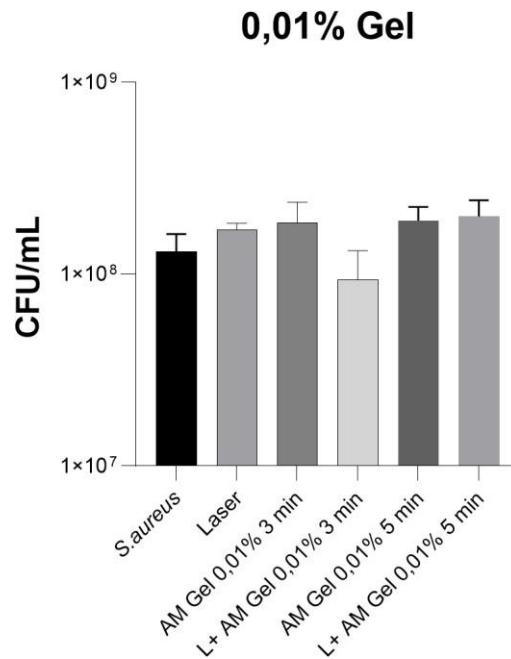


FIGURA 12 - Contagem de UFC/LI após tratamento com AM gel 0,01% e 3 ou 5 min de pré-irradiação

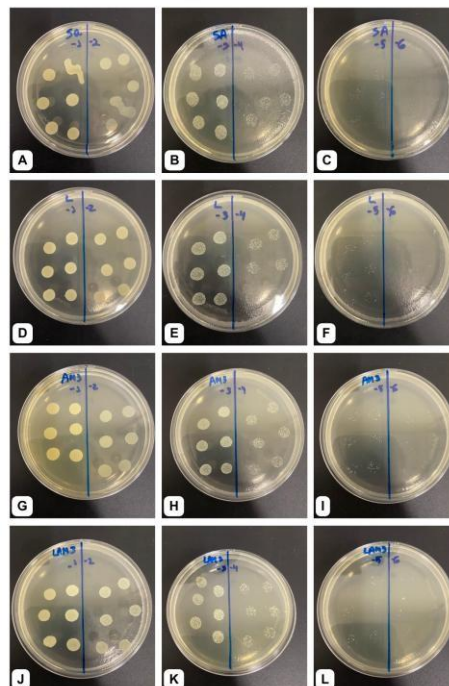


FIGURA 13 - Placas de cultivo de *S. aureus* tratadas com AM gel 0,01% e 3 min de pré-irradiação (A–

C) Grupo Controle (*S. aureus*); (D–F) Grupo Laser. (G–I) Grupo tratado apenas com AM Gel 0,01% com 3 min de pré-irradiação. (J–L) Grupos submetidos à aPDT com AM Gel 0,01% 3 min de pré-irradiação e 5 min de irradiação com laser. Cada placa apresenta duas diluições seriadas, 10⁻¹ a 10⁻⁶.

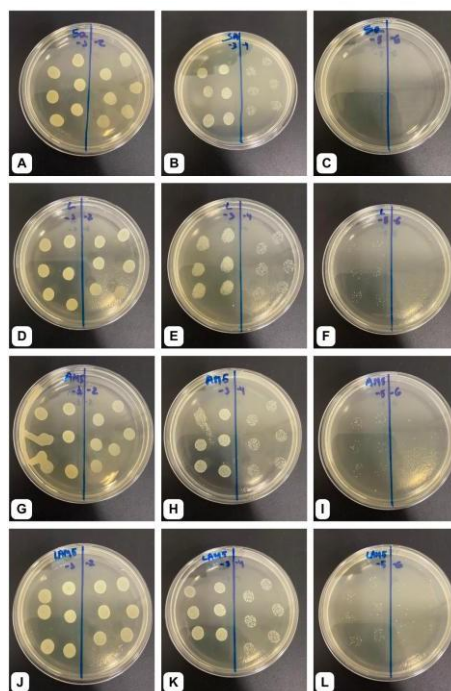


FIGURA 14 - Placas de cultivo de *S. aureus* tratadas com AM gel 0,01% e 3 min de pré-irradiação

(A–C) Grupo Controle (*S. aureus*); (D–F) Grupo Laser. (G–I) Grupo tratado apenas com AM Gel 0,01% com 5 min de pré-irradiação. (J–L) Grupos submetidos à aPDT com AM Gel 0,01% 5 min de pré-irradiação e 5 min de irradiação com laser. Cada placa apresenta duas diluições seriadas, 10^{-1} a 10^{-6} .

5.3.RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, VIABILIDADE CELULAR E RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM FIBROBLASTOS L929

5.3.1. Resultados da Morfologia Celular (Microscopia Óptica – 24h)

A análise morfológica dos fibroblastos L929, após 24 horas de diferentes tratamentos, demonstrou variações na densidade celular e na integridade da monocamada, conforme evidenciado nas micrografias obtidas em triplicata.

As células do grupo controle apresentaram monocamada íntegra, alta densidade celular, morfologia fusiforme típica e distribuição homogênea. O padrão observado entre as três áreas analisadas manteve-se consistente, indicando ausência de alterações estruturais

O grupo irradiado apenas com laser exibiu morfologia e densidade celular semelhantes às do controle, mantendo a aderência e a organização da monocamada. Não foram observados sinais de retração citoplasmática ou de perda celular importante, sugerindo que a irradiação isolada não comprometeu a integridade dos fibroblastos.

Os grupos tratados apenas com AM 0,005%, tanto por 3 quanto por 5 minutos, apresentaram manutenção da monocamada e densidade compatíveis com o controle, mas ligeiramente reduzidas. As células mantiveram seu formato fusiforme e aderência ao substrato.

Nos grupos submetidos à aPDT com AM 0,005%, observou-se redução acentuada da densidade celular, caracterizada por áreas extensas com poucas células aderidas e pela presença de debris celulares. A perda da monocamada foi evidente nas três réplicas, indicando citotoxicidade quando o AM 0,005% foi associado ao laser.

Os fibroblastos expostos apenas ao AM 0,01%, em ambos os tempos de pré-irradiação, apresentaram morfologia preservada, com células distribuídas de forma homogênea e densidade semelhante à do controle, mas ligeiramente reduzidas. Não foram observados sinais relevantes de retração celular ou de perda de aderência.

Os grupos submetidos à aPDT com AM 0,01% mostraram redução intensa na quantidade de células aderidas, padrão compatível com citotoxicidade elevada. As micrografias revelaram quase ausência de monocamada, presença de poucas células residuais e debris dispersos, indicando que a combinação AM 0,01% + laser provocou efeito citotóxico nos fibroblastos L929

EXPERIMENTOS L929 - 24H

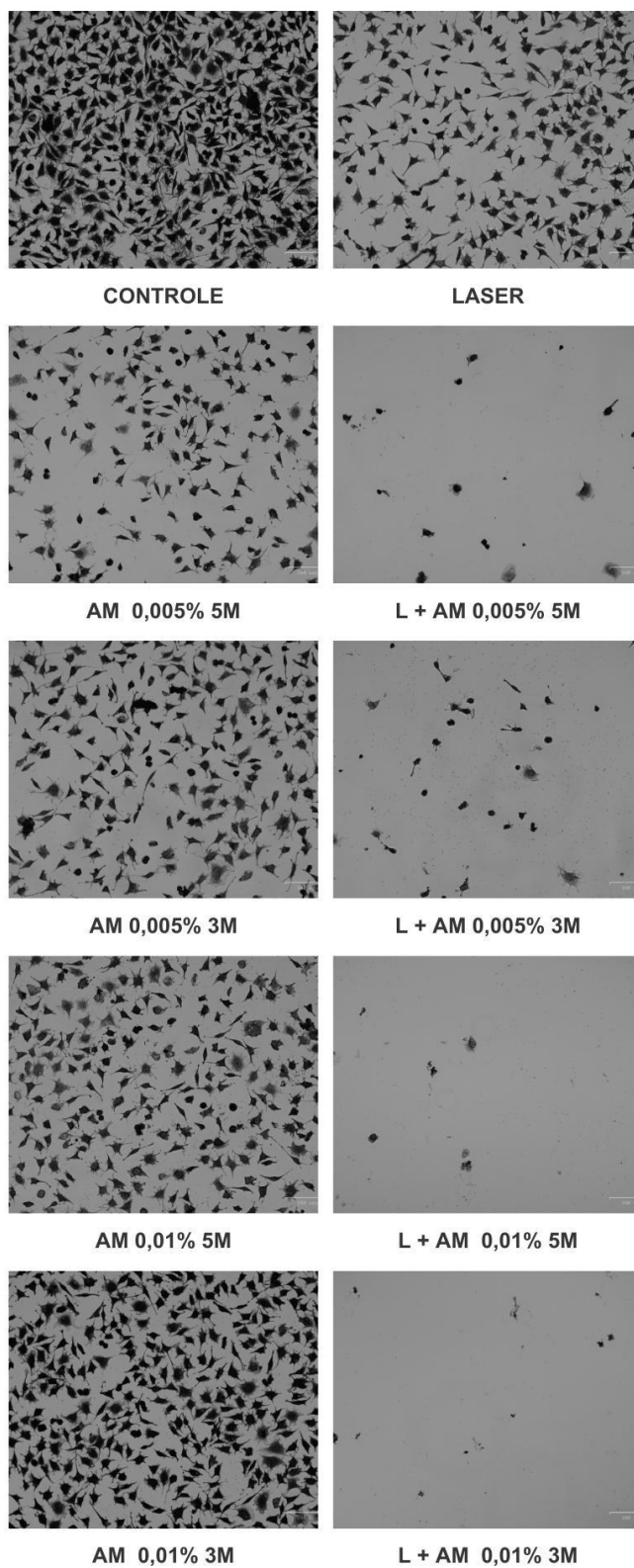


FIGURA 15 - Morfologia de fibroblastos L929 após 24h de incubação. Imagens obtidas em triplicata. Aumento:100um, utilizando o microscópio ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad).

5.3.2. Resultados da Morfologia Celular (Microscopia Óptica – 48h)

A avaliação morfológica dos fibroblastos L929 após 48 horas evidenciou diferenças nítidas entre os grupos, especialmente na comparação entre os tratamentos isolados e a associação AM + laser (aPDT). As micrografias em triplicata revelaram padrões consistentes de densidade celular, aderência e integridade da monocamada.

O grupo controle apresentou monocamada íntegra e densa, com fibroblastos dispostos de forma homogênea e morfologia fusiforme típica. As três réplicas exibiram distribuição celular uniforme, sem alterações estruturais aparentes.

O grupo irradiado apenas com laser demonstrou morfologia semelhante ao controle, com manutenção da alta densidade celular e da arquitetura da monocamada. Não foram observados sinais de retração citoplasmática, perda de aderência ou desorganização celular, indicando que a irradiação isolada não comprometeu a viabilidade dos fibroblastos L929.

Os fibroblastos expostos ao AM 0,005% por 3 ou 5 minutos apresentaram preservação da monocamada, com densidade e morfologia comparáveis ao controle. As células mantiveram aspecto fusiforme e aderência adequada, sugerindo ausência de citotoxicidade relevante do AM isolado nessa concentração.

Os grupos submetidos à aPDT com AM 0,005% exibiram redução na quantidade de células aderidas, com áreas extensas contendo apenas poucas células remanescentes e detritos. Em comparação com 24 horas, não houve sinais de recuperação; ao contrário, a baixa densidade celular persistiu de forma consistente nas triplicatas, reforçando o efeito citotóxico da combinação AM 0,005% + laser.

Os fibroblastos tratados apenas com AM 0,01%, independentemente do tempo de pré-irradiação, mantiveram monocamada organizada, com morfologia celular preservada, embora a densidade fosse um pouco diminuída comparada ao controle. A distribuição homogênea e a integridade da camada celular foram semelhantes às observadas no controle e no grupo laser isolado.

A associação AM 0,01% + laser resultou em perda quase completa da monocamada, com raras células aderidas e presença de debris celulares. O padrão observado foi semelhante ao registrado com AM 0,005% + laser, indicando citotoxicidade evidente quando o AM, em ambas as concentrações, é associado à

irradiação.

EXPERIMENTOS L929 - 24H

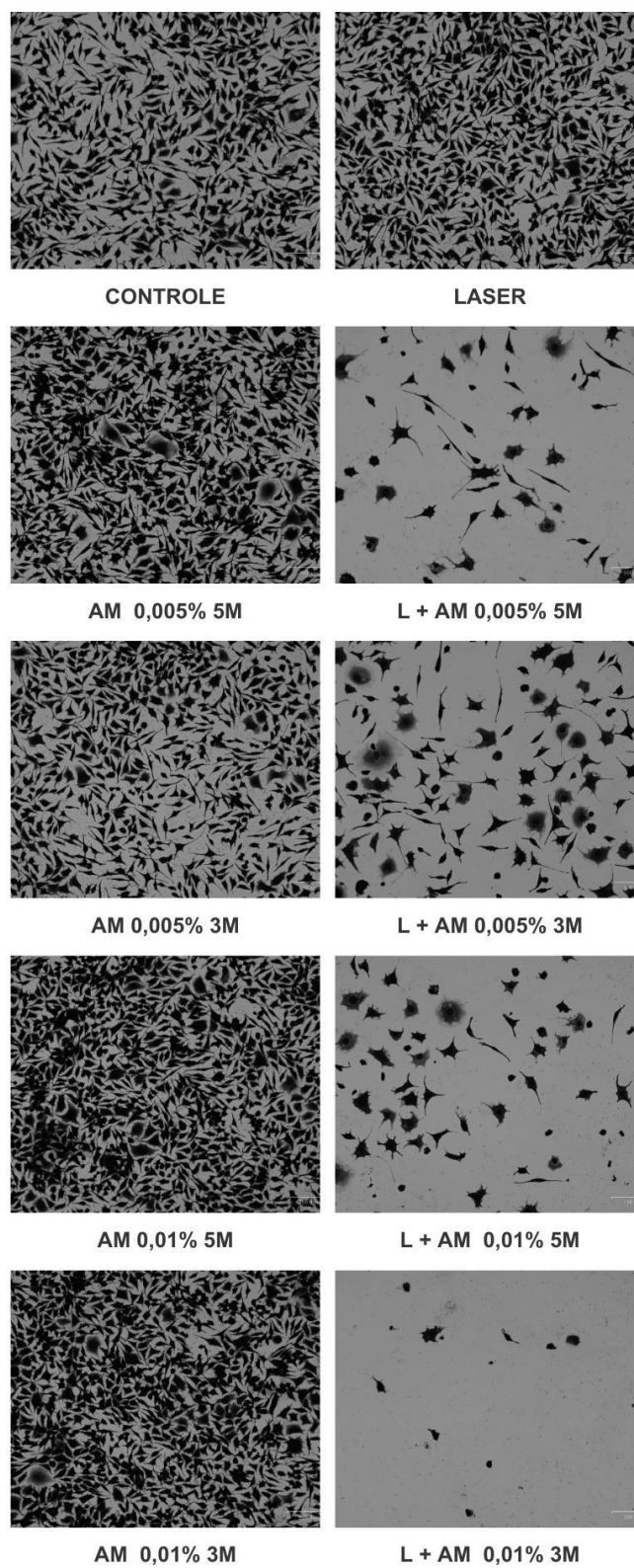


FIGURA 16 - Morfologia de fibroblastos L929 após 48h de incubação. Imagens obtidas em triplicata. Aumento:100um, utilizando o microscópio ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad).

5.3.3. Viabilidade Celular – Ensaio de MTT

A viabilidade celular dos fibroblastos L929 após os diferentes tratamentos foi avaliada pelo ensaio de MTT, que permite quantificar a atividade metabólica mitocondrial e, portanto, inferir possíveis efeitos citotóxicos decorrentes da exposição ao azul de metileno e/ou à irradiação laser. As análises foram realizadas em dois períodos de incubação, 24 h e 48 h, e compararam os grupos controle, laser isolado, azul de metileno nas concentrações de 0,005% e 0,01% (3 e 5 minutos de pré-incubação), bem como os grupos submetidos à terapia fotodinâmica antimicrobiana (L+AM).

5.3.3.1. Resultados do ensaio de MTT – 24 horas

Após 24 horas de incubação, o grupo controle manteve viabilidade celular próxima de 100%. O grupo tratado apenas com laser apresentou redução discreta da viabilidade, com valores em torno de 70–85%, diferindo do controle ($p < 0,05$).

Os grupos tratados apenas com azul de metileno, independentemente da concentração (0,005% ou 0,01%) e do tempo de pré-irradiação, apresentaram redução moderada da viabilidade celular, com valores variando aproximadamente entre 45% e 70%, sendo significativamente inferiores ao controle ($p < 0,01$ a $p < 0,0001$).

Em contraste, os grupos submetidos à terapia fotodinâmica antimicrobiana (L+AM) exibiram acentuada redução da viabilidade celular, com valores inferiores a 30% em todas as condições avaliadas. Observou-se que a associação L+AM 0,005% resultou em viabilidade residual em torno de 20–25%, enquanto a associação L+AM 0,01% apresentou valores ainda mais baixos, frequentemente inferiores a 15%. Esses grupos diferiram significativamente de todos os demais ($p < 0,0001$).

Esses resultados indicam que, após 24 horas, a combinação entre azul de metileno e irradiação laser foi o principal fator associado à citotoxicidade, independentemente do tempo de pré-irradiação considerado.

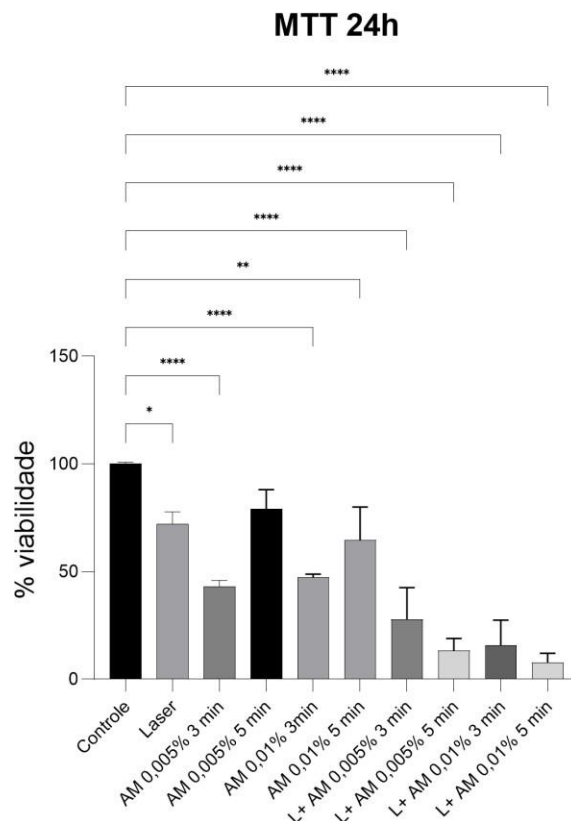


FIGURA 17 - Viabilidade celular no ensaio de MTT após 24 horas

Viabilidade celular de fibroblastos L929 após tratamento com laser e azul de metileno (0,005% e 0,01%), considerando conjuntamente os tempos de pré-irradiação de 3 e 5 minutos. Resultados expressos como porcentagem em relação ao controle (100%). Dados apresentados como média $\pm$ DP ($n = 3$). Análise estatística por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,0001$).

5.3.3.2. Resultados do ensaio de MTT – 48 horas

Após 48 horas de incubação, o grupo controle manteve viabilidade próxima de 100%, assim como o grupo tratado apenas com laser, que apresentou valores entre 90% e 100%, sem diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Os grupos tratados apenas com azul de metileno (0,005% e 0,01%), independentemente do tempo de pré-irradiação, também mantiveram viabilidade elevada, geralmente acima de 85%, indicando ausência de citotoxicidade detectável nessas condições após 48 horas.

Por outro lado, os grupos submetidos à terapia fotodinâmica antimicrobiana (L+AM) apresentaram redução acentuada e persistente da viabilidade celular. Os valores observados foram inferiores a 15% para L+AM 0,005% e frequentemente

próximos ou inferiores a 5% para L+AM 0,01%, sendo significativamente menores em relação a todos os demais grupos ($p < 0,0001$).

Esses achados demonstram que a citotoxicidade observada nos grupos L+AM não foi revertida ao longo do tempo, permanecendo evidente mesmo após 48 horas de incubação, enquanto os tratamentos isolados mantiveram biocompatibilidade celular.

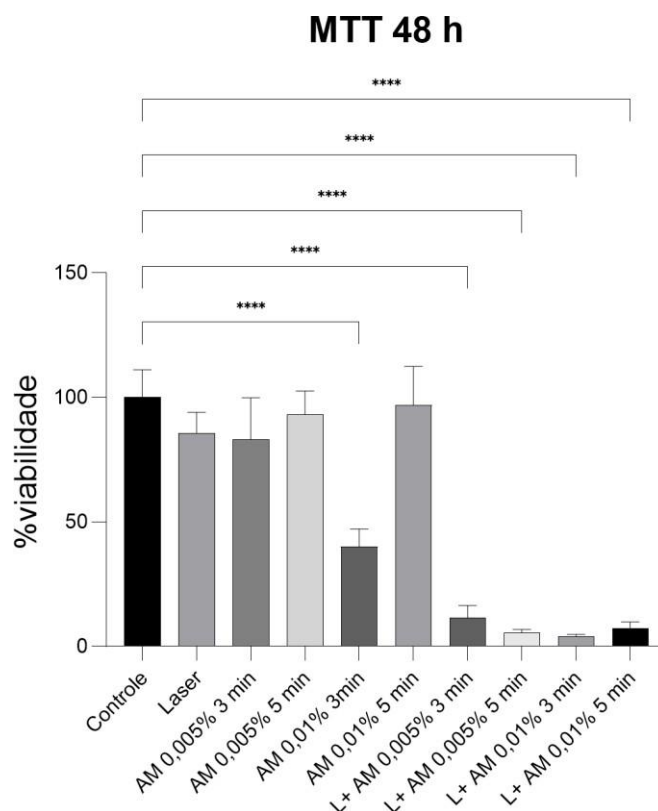


FIGURA 18 - Viabilidade celular no ensaio de MTT após 48 horas

Viabilidade celular de fibroblastos L929 após tratamento com laser e azul de metileno (0,005% e 0,01%), considerando conjuntamente os tempos de pré-irradiação de 3 e 5 minutos. Resultados expressos como porcentagem em relação ao controle (100%). Dados apresentados como média $\pm$ DP ($n = 3$). Análise estatística por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey ($***p < 0,0001$).

5.3.4. Integridade da Monocamada – Ensaio de Cristal Violeta

A integridade e a densidade da monocamada de fibroblastos L929 após os diferentes tratamentos foram avaliadas pelo ensaio de Cristal Violeta, método que quantifica células aderidas à superfície da placa com base na fixação do corante aos componentes estruturais celulares. Esse ensaio permite detectar alterações de aderência, perda de monocamada ou danos morfológicos que podem ocorrer

mesmo quando a atividade metabólica permanece preservada. As análises foram conduzidas após 24 e 48 h de incubação, comparando os grupos controle, laser isolado, azul de metileno nas concentrações de 0,005% e 0,01% (3 e 5 minutos de pré-incubação), e os grupos submetidos à terapia fotodinâmica antimicrobiana (L+AM).

5.3.4.1. Resultados do ensaio de Cristal Violeta – 24 horas

Após 24 horas de incubação, o grupo controle apresentou retenção de Cristal Violeta próxima de 100%. O grupo submetido apenas à irradiação com laser apresentou valores de retenção entre aproximadamente 60% e 75%, com diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,01$).

Os grupos tratados apenas com azul de metileno, nas concentrações de 0,005% e 0,01%, independentemente do tempo de pré-irradiação, apresentaram retenção do corante entre aproximadamente 50% e 65%, com valores significativamente inferiores ao grupo controle ($p < 0,01$ a $p < 0,001$).

Os grupos submetidos à associação entre laser e azul de metileno (L+AM) apresentaram os menores valores de retenção do corante. O grupo L+AM 0,005% apresentou valores entre aproximadamente 15% e 20%, enquanto o grupo L+AM 0,01% apresentou valores próximos ou inferiores a 15%, ambos significativamente diferentes dos demais grupos ($p < 0,0001$).

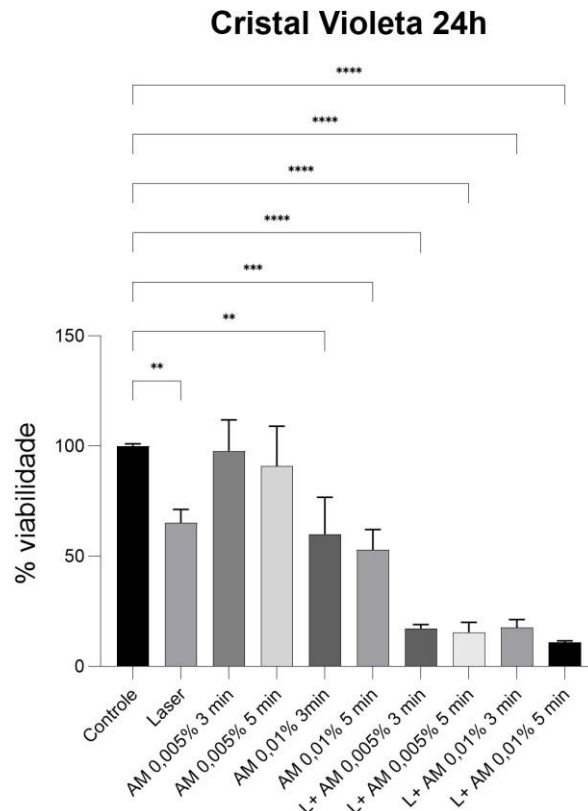


FIGURA 19 - Cristal violeta após 24 horas

Retenção de Cristal Violeta em fibroblastos L929 após 24 h de incubação, considerando conjuntamente os tempos de pré-irradiação de 3 e 5 minutos. Resultados expressos como porcentagem em relação ao controle (100%). Dados apresentados como média $\pm$ DP (n = 3). Análise estatística realizada por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey (**p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001).

5.3.4.2. Resultados do ensaio de Cristal Violeta – 48 horas

Após 48 horas de incubação, o grupo controle apresentou retenção de Cristal Violeta próxima de 100%. O grupo tratado apenas com laser apresentou valores de retenção entre aproximadamente 70% e 80%, com diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p < 0,01).

Os grupos tratados apenas com azul de metileno, nas concentrações de 0,005% e 0,01%, independentemente do tempo de pré-irradiação, apresentaram valores de retenção entre aproximadamente 45% e 55%, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (p < 0,0001).

Os grupos submetidos à associação entre laser e azul de metileno (L+AM) apresentaram valores de retenção inferiores a 15% em todas as condições avaliadas. O grupo L+AM 0,005% apresentou valores entre aproximadamente 10%

e 15%, enquanto o grupo L+AM 0,01% apresentou valores próximos ou inferiores a 10%, ambos significativamente diferentes dos demais grupos ($p < 0,0001$).

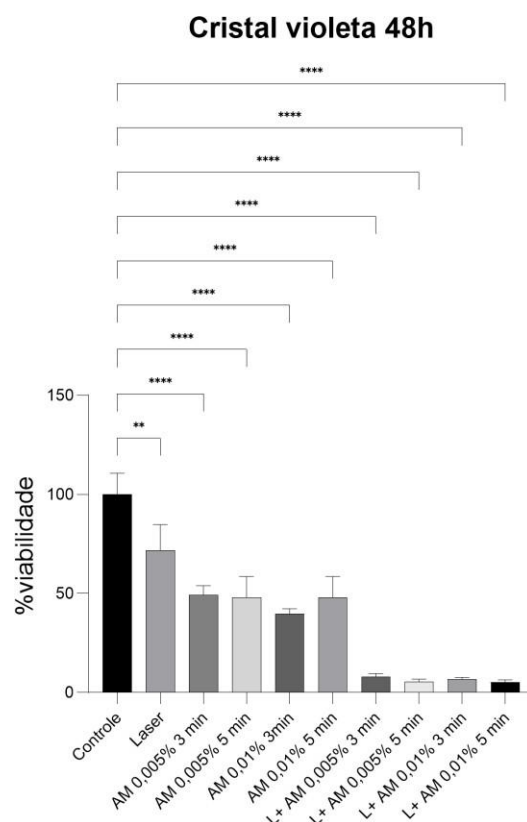


FIGURA 20 - Cristal violeta após 48 horas

Retenção de Cristal Violeta em fibroblastos L929 após 48 h de incubação, considerando conjuntamente os tempos de pré-irradiação de 3 e 5 minutos. Resultados expressos como porcentagem em relação ao controle (100%). Dados apresentados como média $\pm$ DP ($n = 3$). Análise estatística realizada por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$).

5.3.5. Produção de Nitrito – Teste de Griess

A produção de óxido nítrico (NO) pelos fibroblastos L929 após os diferentes tratamentos foi avaliada pelo teste de Griess, método colorimétrico que quantifica nitrito (NO_2^-), o principal metabólito estável do NO no meio extracelular. Essa análise permite investigar se a exposição ao azul de metileno, à irradiação laser ou à sua combinação induz alterações relacionadas ao estresse nitrosativo ou à ativação de vias inflamatórias. As dosagens foram realizadas após 24 h e 48 h de incubação nos grupos controle, laser isolado, azul de metileno nas concentrações

de 0,005% e 0,01% (3 e 5 minutos de pré-incubação) e nos grupos submetidos à terapia fotodinâmica antimicrobiana.

5.3.5.1. Resultados do teste de Griess – 24 horas

Após 24 horas de incubação, o grupo controle apresentou concentrações de nitrito entre aproximadamente 3,5 e 4,0 μM . O grupo submetido apenas à irradiação com laser apresentou valores entre aproximadamente 3,6 e 3,9 μM , com diferença estatisticamente significativa em relação ao controle em algumas comparações ($p < 0,05$).

Os grupos tratados apenas com azul de metileno, nas concentrações de 0,005% e 0,01%, independentemente do tempo de pré-irradiação, apresentaram concentrações de nitrito variando entre aproximadamente 2,8 e 3,5 μM .

Os grupos submetidos à associação entre laser e azul de metileno (L+AM) apresentaram concentrações de nitrito entre aproximadamente 3,4 e 4,0 μM . As comparações estatísticas não indicaram aumento significativo das concentrações de nitrito nos grupos L+AM em relação aos demais grupos avaliados.

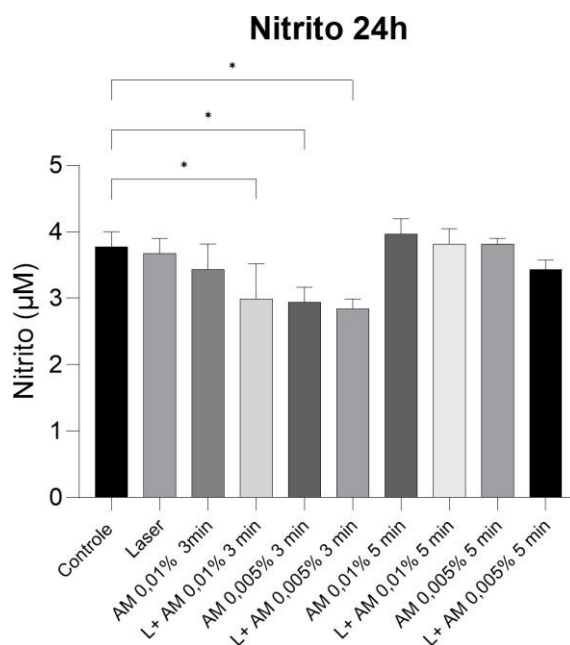


FIGURA 21 - Concentração de nitrito após 24 horas

Concentração de nitrito (μM) em fibroblastos L929 após 24 h de incubação, considerando conjuntamente os tempos de pré-irradiação de 3 e 5 minutos. Dados apresentados como média $\pm$ DP ($n = 3$). Análise estatística realizada por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey ($*p < 0,05$).

5.3.5.2. Resultados do teste de Griess – 48 horas

Após 48 horas de incubação, o grupo controle apresentou concentrações de nitrito entre aproximadamente 3,0 e 3,2 μM . O grupo tratado apenas com laser apresentou valores entre aproximadamente 3,2 e 3,4 μM .

Os grupos tratados apenas com azul de metileno, nas concentrações de 0,005% e 0,01%, independentemente do tempo de pré-irradiação, apresentaram concentrações de nitrito variando entre aproximadamente 2,6 e 3,6 μM .

Os grupos submetidos à associação entre laser e azul de metileno (L+AM) apresentaram concentrações de nitrito entre aproximadamente 2,3 e 4,0 μM . A análise estatística não indicou diferenças significativas entre os grupos avaliados nesse período experimental.

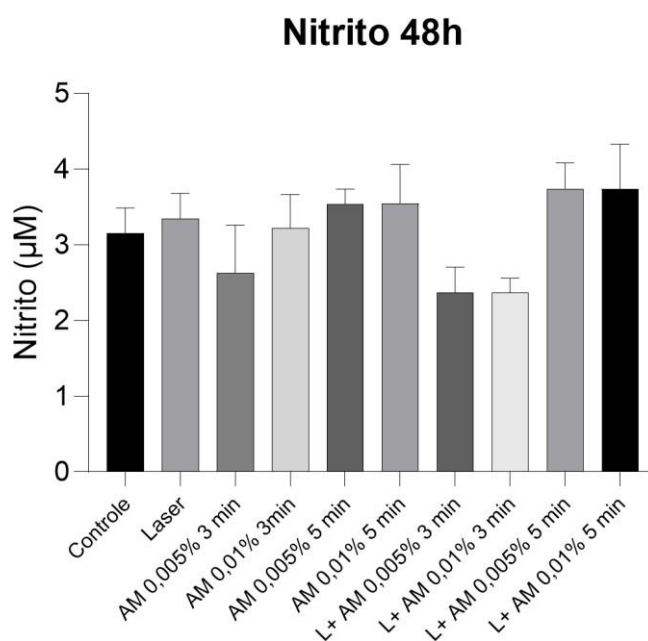


FIGURA 22 - Concentração de nitrito após 48 horas

Concentração de nitrito (μM) em fibroblastos L929 após 48 h de incubação, considerando conjuntamente os tempos de pré-irradiação de 3 e 5 minutos. Dados apresentados como média $\pm$ DP ($n = 3$). Análise estatística realizada por ANOVA de uma via, sem diferenças significativas entre os grupos.

6. DISCUSSÃO

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT) vem sendo discutida como alternativa viável diante da resistência crescente aos antimicrobianos. O *S. aureus* continua sendo um dos principais desafios clínicos, especialmente devido à colonização nasal e ao risco de infecções subsequentes. Além disso, é muito importante que esta terapia também seja segura para os tecidos do paciente.

Sabemos que existem vários trabalhos utilizando aPDT em bactérias, incluindo a *S. aureus* (Soares *et al.*, 2024; Schreiner *et al.*, 2018; Bezerra *et al.*, 2025; Pérez-Laguna *et al.*, 2020), porém, a padronização *in vitro* é um passo experimental muito importante para que tenhamos estudos mais homogêneos e com resultados consistentes. Neste estudo, foram utilizadas diferentes formas de apresentação do azul de metileno (AM), já disponíveis comercialmente para uso (Chimiolux, DMC, Brasil), o que o torna mais seguro em relação à concentração padronizada, ao método de condicionamento e à validade determinada. Isso é interessante, uma vez que, futuramente, podemos utilizá-lo em estudos clínicos e ter uma base de comparação entre os trabalhos.

Os resultados mostraram que o uso do azul de metileno em solução líquida, em ambos os tempos de pré-irradiação, sem ativação pela irradiação com laser de 660 nm, não foi eficaz em inibir o crescimento bacteriano de *S. aureus*, conforme já descrito na literatura (Virych *et al.*, 2021). Já quando associado ao tratamento com laser de 660 nm (5 minutos) nas concentrações líquidas de azul de metileno, 0,005% e 0,01%, com tempo de pré-irradiação de 3 minutos, houve uma redução significativa na presença de *S. aureus*. Embora esse resultado não tenha promovido a eliminação completa da bactéria, ele é relevante, uma vez que a inativação parcial por aPDT não induz resistência bacteriana, permitindo a realização de tratamentos subsequentes sem perda de eficácia (Street *et al.*, 2009). Além disso, essa característica favorece a aplicação de ciclos repetidos de descolonização em pacientes com risco persistente de recolonização por *Staphylococcus aureus*, mantendo a aPDT como uma estratégia viável ao longo do tempo (Septimus *et al.*, 2016; Kallen *et al.*, 2011).

Quando o tratamento de aPdt foi realizado com uma pré irradiação de 5 minutos, tanto nas concentrações de azul de metileno 0,01% como de 0,005%, este

apresentou desempenho superior ao de 3 minutos, uma vez que foi capaz de eliminar todas as bactérias planctônicas indicando que um período ligeiramente maior favorece a interação do fotossensibilizador com a bactéria antes da ativação luminosa. A eliminação total observada nos grupos irradiados reforça a ideia de que os parâmetros empregados foram suficientes para induzir dano fotodinâmico significativo, semelhante ao observado em outros estudos (Caires *et al.*, 2024).

Estes resultados prévios são de grande interesse, uma vez que o tratamento para a eliminação de *S. aureus* em pacientes seria muito promissor. A cavidade nasal é um local em que a *S. aureus* pode estar presente (Krismer *et al.*, 2017) e alguns estudos verificaram que estas bactérias não se encontram em grandes biofilmes e sim em associação com outras bactérias ou em pequenos grupos e de maneira dispersa (Krismer *et al.*, 2017; Burian, *et al.*, 2010), por isso a análise em culturas planctônicas se aproximariam mais do que estudos em biofilmes.

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo demonstraram que pacientes com doença crônica do fígado e que vão para a hemodiálise apresentam uma maior prevalência de *S. aureus* na cavidade nasal do que a população em geral (Bezerra *et al.*, 2025). Além disso, a colonização nasal por *S. aureus* está correlacionada com maior susceptibilidade à asma em crianças e adultos jovens e a disbiose na comunidade nasal está associada a doenças crônicas do trato respiratório superior, como rinossinusite crônica ou doenças alérgicas das vias aéreas (Krismer *et al.*, 2017). Assim, o uso de uma terapia alternativa que pudesse eliminar a bactéria, sem necessidade de antibioticoterapia, com o tempo de tratamento otimizado, seria muito interessante.

Em relação ao gel de azul de metileno a 0,01% (Chimiolux, DMC, Brasil), tanto com a pré-irradiação por 3 como por 5 minutos, não houve efeito antimicrobiano em nenhuma condição testada. O desempenho insatisfatório parece estar relacionado à própria formulação, já que sua viscosidade provavelmente dificultou a difusão do azul de metileno e limitou a interação com as células bacterianas. Como apenas uma concentração foi avaliada, não é possível afirmar se ajustes na dose resolveriam essa limitação. Mesmo assim, os resultados indicam claramente que, nas condições *in vitro* empregadas, o gel não apresentou atividade fotodinâmica mensurável, apesar de seu potencial clínico, devido à maior permanência em superfícies mucosas.

Embora a terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno demonstre eficácia antimicrobiana significativa, inclusive contra cepas resistentes, a sua aplicação clínica em tecidos vulneráveis exige avaliação criteriosa da citotoxicidade a células eucarióticas.

Nos ensaios com fibroblastos, observou-se uma redução da viabilidade celular nos tempos de pré-irradiação mais longos. Esse efeito deve ser interpretado com cautela, considerando que o modelo *in vitro* expõe as células a condições que não refletem plenamente o ambiente biológico real. Em cultura, o fotossensibilizador permanece em contato contínuo com as células, e a luz incide diretamente, o que aumenta a sensibilidade das células eucarióticas (Ancely *et al.*, 2017; Petrellis *et al.*, 2019). Dessa forma, os danos observados não representam necessariamente o comportamento esperado em tecido vivo, mas ajudam a identificar limites superiores de exposição que não devem ser ultrapassados.

A redução da viabilidade com tempos de pré-irradiação mais longos indica que a combinação entre AM e luz ultrapassou a faixa segura para fibroblastos neste modelo experimental. Esses dados, porém, têm valor importante, pois permitem delimitar a janela terapêutica em que a ação antimicrobiana ocorre sem prejuízo às células eucarióticas. Estudos com fibroblastos murinos (NIH/3T3) evidenciam que, sob protocolos de alta dose, ocorrem redução da viabilidade e ativação de vias apoptóticas (Lamarque *et al.*, 2020).

Sabe-se que os fibroblastos podem produzir óxido nítrico espontaneamente, e há o aumento na presença de citocinas pro-inflamatórias, podendo ser um agente antimicrobiano (Wang *et al.*, 1996). O óxido nítrico (NO) apresenta reconhecida ação antimicrobiana, mediada principalmente pela geração de espécies reativas de nitrogênio (RNS). Estas moléculas atuam contra microrganismos por diferentes mecanismos, incluindo a desaminação de DNA, a S-nitrosilação de grupos tióis e a peroxidação lipídica. Como consequência, ocorrem danos estruturais e funcionais nas membranas celulares microbianas, bem como comprometimento de proteínas essenciais à manutenção da viabilidade e dos processos metabólicos do patógeno (Okda *et al.*, 2025). Assim, analisamos a produção de NO pelos fibroblastos L929 após o tratamento com aPDT, por observamos que não houve diferença entre os grupos que foi realizado o tratamento com aPDT em relação aos grupos controles. Isso pode ter ocorrido devido à redução na viabilidade celular, assim, seria interessante estudos futuros com outras

linhagens celulares e também com diferentes doses de energia luminosa a ser utilizada de maneira que seja eficiente na eliminação de bactérias e segura em relação às células do hospedeiro ao mesmo tempo.

Na prática clínica, a distribuição do fotossensibilizador é mais ampla, há fluxo sanguíneo e a energia luminosa é parcialmente dissipada, o que resulta em menor impacto direto sobre fibroblastos. Isso reforça que os efeitos observados *in vitro* representam uma condição mais extrema do que a observada *in vivo*.

Diante desses resultados, é possível identificar parâmetros que combinam boa ação antimicrobiana com menor impacto sobre células eucarióticas, especialmente quando se considera o AM em solução líquida. Por outro lado, a formulação em gel avaliada não demonstrou eficácia nas condições deste estudo. A distinção entre o desempenho das duas formulações contribui para orientar ajustes futuros e reforça a importância de avaliar simultaneamente a eficácia e a segurança no desenvolvimento de protocolos de aPDT. Como perspectiva futura, torna-se relevante investigar modificações na formulação em gel, como ajustes na concentração do fotossensibilizador ou nas propriedades físico-químicas do veículo, bem como avaliar diferentes parâmetros de irradiação e modelos biológicos mais complexos. Além disso, estudos que avancem para modelos *ex vivo* ou clínicos poderão contribuir para validar os achados *in vitro* e consolidar protocolos mais eficientes, seguros e aplicáveis à prática clínica.

Considerando o conjunto de achados, o estudo confirma o potencial do azul de metileno em solução líquida para uso antimicrobiano, desde que respeitados os limites identificados nos ensaios celulares. A formulação em gel, ao contrário, não apresentou resultados que sustentem sua aplicação na forma testada. A compreensão clara dessa relação entre eficácia e segurança fornece uma base sólida para aprimorar parâmetros futuros e orientar investigações mais detalhadas sobre a aPDT aplicada ao controle de *S. aureus*.

7. CONCLUSÃO

- A solução líquida de azul de metileno nas concentrações de 0,005% e 0,01%, associada ao laser de 660 nm, apresentou ação antimicrobiana significativa contra *Staphylococcus aureus* em modelo planctônico.
- O tempo de pré-irradiação de 5 minutos foi o parâmetro mais eficiente, promovendo eliminação total de *S. aureus* nos grupos tratados com solução de AM, caracterizando o ponto central do estudo.
- O tempo de 3 minutos resultou em reduções menores em comparação com 5 minutos, reforçando a importância do tempo de pré-irradiação para a interação adequada entre o fotossensibilizador e o microrganismo.
- A formulação em gel de azul de metileno a 0,01% não apresentou atividade antimicrobiana nas condições avaliadas.
- Nos fibroblastos L929, alguns parâmetros resultaram em redução da viabilidade, especialmente em tempos de pré-irradiação mais longos, o que evidencia a necessidade de atenção na escolha dos parâmetros experimentais.
- Foi possível identificar condições que mantiveram boa ação antimicrobiana e impacto celular reduzido, contribuindo para o delineamento de uma faixa de uso mais segura.
- Os resultados confirmam o potencial da solução líquida de azul de metileno para aplicação antimicrobiana, desde que sejam utilizados parâmetros compatíveis com a viabilidade celular observada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allamyradov Y, ben Yosef J, Annamuradov B, Ateyeh M, Street C, Whipple H, Er AO. Photodynamic Therapy Review: Past, Present, Future, Opportunities and Challenges. *Photochem.* 2024; 4(4):434-461. <https://doi.org/10.3390/photochem4040027>

Amorim AS, Arnaut ZA, Mata AI, Pucelik B, Barzowska A, da Silva GJ, Pereira MM, Dąbrowski JM, Arnaut LG. Efficient and Selective, In Vitro and In Vivo, Antimicrobial Photodynamic Therapy with a Dicationic Chlorin in Combination with KI. *ACS Infect Dis.* 2024 Sep 13;10(9):3368-3377. doi: 10.1021/acsinfecdis.4c00492. Epub 2024 Aug 16. PMID: 39150769; PMCID: PMC11406520.

Bartolomeu M, Rocha S, Cunha Â, Neves MG, Faustino MA, Almeida A. Effect of Photodynamic Therapy on the Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol.* 2016 Mar 7;7:267. doi: 10.3389/fmicb.2016.00267. PMID: 27014198; PMCID: PMC4780358.

Bawankar NS, Meshram PP, John R, Gedam DS, Bhise SM, Ranshoor NA, Bais SR. Uncovering the silent public health threat: nasal carriers of linezolid-resistant, vancomycin-intermediate and mupirocin-resistant MRSA among healthcare workers in a tertiary care hospital in Central India. *GMS Hyg Infect Control.* 2025 May 8;20:Doc18. doi: 10.3205/dgkh000547. PMID: 40529469; PMCID: PMC12171979.

Benov L. Photodynamic therapy: current status and future directions. *Med Princ Pract.* 2015;24 Suppl 1(Suppl 1):14-28. doi: 10.1159/000362416. Epub 2014 May 10. PMID: 24820409; PMCID: PMC6489067.

Bezerra, DT. Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) na descolonização nasal de pacientes renais crônicos dialíticos portadores de *Staphylococcus aureus*: estudo clínico randomizado controlado e cego. 2021. 100 f. Tese (Doutorado em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde) – Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2021.

Bezerra DT, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KPS, Bussadori SK, Motta LJ, Ando-Suguimoto ES, Frochot C, Perini AM, Rossi F, Mimica MJ, Pereira BJ, Horliana ACRT. Prevalence of Nasal *Staphylococcus aureus* Carriage in Patients Undergoing Hemodialysis and Assessment of Risk Factors: A Cross-Sectional Study of Outpatients at a University Hospital. *Healthcare (Basel).* 2025 Jan 26;13(3):245. doi: 10.3390/healthcare13030245. PMID: 39942434; PMCID: PMC11816970.

Bitunguramye A, Nkundimana G, Aboubasha AM, Kabahizi J, Rutikanga W, Nshimiyimana L, Rafiki MG. Incidence, Risk Factors, Organism Types, and Outcomes of Catheter-Related Bloodstream Infections in Hemodialysis Patients. *Cureus.* 2024 Sep 16;16(9):e69554. doi: 10.7759/cureus.69554. PMID: 39291254; PMCID: PMC11406115.

Burian M, Rautenberg M, Kohler T, Fritz M, Krismer B, Unger C, Hoffmann WH, Peschel A, Wolz C, Goerke C. Temporal expression of adhesion factors and activity of global regulators during establishment of *Staphylococcus aureus* nasal

colonization. *J Infect Dis.* 2010 May 1;201(9):1414-21. doi: 10.1086/651619. PMID: 20307206.

Caires CSA, Lima AR, Lima THN, Silva CM, Araujo LO, Aguilera LF, Nascimento VA, Caires ARL, Oliveira SL. Photodynamic inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by using Giemsa dye as a photosensitizer. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2024 Feb;45:103952. doi: 10.1016/j.pdpdt.2023.103952. Epub 2023 Dec 24. PMID: 38145771.

Campos Chaves Lamarque G, Cusicanqui Méndez DA, Arruda Matos A, José Dionísio T, Andrade Moreira Machado MA, Magalhães AC, Cardoso Oliveira R, Cruvinel T. Cytotoxic effect and apoptosis pathways activated by methylene blue-mediated photodynamic therapy in fibroblasts. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020 Mar;29:101654. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101654. Epub 2020 Jan 7. PMID: 31923637.

Carreño EA, Alberto AVP, de Souza CAM, de Mello HL, Henriques-Pons A, Anastacio Alves L. Considerations and Technical Pitfalls in the Employment of the MTT Assay to Evaluate Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Applied Sciences.* 2021; 11(6):2603. <https://doi.org/10.3390/app11062603>

Chakraborty S, Mohanty D, Chowdhury A, Krishna H, Taraphdar D, Chitnis S, Sodani S, Sahu K, Majumder SK. In vitro photoinactivation effectiveness of a portable LED device aimed for intranasal photodisinfection and a photosensitizer formulation comprising methylene blue and potassium iodide against bacterial, fungal, and viral respiratory pathogens. *Lasers Med Sci.* 2024 Feb 14;39(1):60. doi: 10.1007/s10103-024-03996-2. PMID: 38353734.

Chang WY, Chen CY. Antifouling Zwitterionic Nanofibrous Wound Dressing for Long-Lasting Antibacterial Photodynamic Therapy. *ACS Omega.* 2023 Sep 28;8(40):36906-36918. doi: 10.1021/acsomega.3c03964. PMID: 37841143; PMCID: PMC10569006.

Chen F, Kang R, Tang D, Liu J. Ferroptosis: principles and significance in health and disease. *J Hematol Oncol.* 2024 Jun 6;17(1):41. doi: 10.1186/s13045-024-01564-3. PMID: 38844964; PMCID: PMC11157757.

Chen P, Ma Y, Xiao Y. How does *Staphylococcus aureus* successfully colonize the nasal cavity. *Crit Rev Microbiol.* 2025 Nov;51(6):1179-1198. doi: 10.1080/1040841X.2025.2486171. Epub 2025 Apr 17. PMID: 40243667.

Chow JW, Yu VL. *Staphylococcus aureus* nasal carriage in hemodialysis patients. Its role in infection and approaches to prophylaxis. *Arch Intern Med.* 1989 Jun;149(6):1258-62. PMID: 2658896.

Dadashi M, Hajikhani B, Darban-Sarokhalil D, van Belkum A, Goudarzi M. Mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*: A systematic review and meta-analysis. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020 Mar;20:238-247. doi: 10.1016/j.jgar.2019.07.032. Epub 2019 Aug 20. PMID: 31442624.

Dinh KM, Kaspersen KA, Boldsen JK, Ellermann-Eriksen S, Ostrowski SR, Aagaard B, Hjalgrim H, Pedersen OB, Erikstrup LT, Erikstrup C. Evaluating infection risk associated with *Staphylococcus aureus* nasal carriage in blood donors: a prospective multicentre study in Denmark. *Clin Microbiol Infect*. 2025 Jul;31(7):1180-1186. doi: 10.1016/j.cmi.2025.02.021. Epub 2025 Feb 26. PMID: 40021086.

Dos Santos AF, Terra LF, Wailemann RA, Oliveira TC, Gomes VM, Mineiro MF, Meotti FC, Bruni-Cardoso A, Baptista MS, Labriola L. Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2017 Mar 15;17(1):194. doi: 10.1186/s12885-017-3179-7. PMID: 28298203; PMCID: PMC5353937.

Dos Santos JNS, Andrade ALS, Arcanjo LHM, Nascimento JFS, Rocha LOB, Pereira RS, et al. Colonização nasal e em orofaringe por *Staphylococcus aureus* em crianças e adolescentes de um bairro do município de Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. *Saude.Com*. 2021;17(4). doi:10.22481/rsc.v17i4.8497

Erwin DZ, Chen P. Mupirocin. [Updated 2024 Jan 11]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK599499/>

Gambacurta A, Tullio V, Savini I, Catani MV, Gasperi V. In Vitro Cell-Based MTT and Crystal Violet Assays for Drug Toxicity Screening. *Methods Mol Biol*. 2025;2834:293-301. doi: 10.1007/978-1-0716-4003-6_14. PMID: 39312171.

Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci*. 2004 May;3(5):436-50. doi: 10.1039/b311900a. Epub 2004 Feb 12. PMID: 15122361; PMCID: PMC3071049.

Herigstad B, Hamilton M, Heersink J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microbiol Methods*. 2001 Mar 1;44(2):121-9. doi: 10.1016/s0167-7012(00)00241-4. PMID: 11165341.

Herwaldt LA. Reduction of *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in dialysis patients. *J Hosp Infect*. 1998 Sep;40 Suppl B:S13-23. doi: 10.1016/s0195-6701(98)90200-6. PMID: 9777529.

Hoffman T, Margalit I, Tabah A, Ruckly S, Barbier F, Singer P, Timsit JF, Prendki V, Hassoun-Kheir N, Buetti N, Yahav D; EUROBACT-2 Study Group, the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), the European Society of Clinical Microbiology, Infectious Diseases (ESCMID) Study Groups for Infections in Critically Ill Patients (ESGCIP), Infections in the Elderly (ESGIE), the OUTCOMEREA Network. Risk Factors for Mortality Among Older Adults with Hospital-Acquired Bloodstream Infections in the Intensive Care Unit: A Multicenter Cohort Study. *Infect Dis Ther*. 2025 Feb;14(2):483-492. doi: 10.1007/s40121-024-01104-z. Epub 2025 Jan 11. PMID: 39794673; PMCID: PMC11829854.

Hu D, Hong L, Ye T, Yang B, Wang L. Risk factors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in the nasal cavity of people living with HIV: a

cross-sectional study from Dongyang Hospital, Zhejiang Province. *Front Microbiol.* 2025;16. doi:10.3389/fmicb.2025.1634460

Ioannou P, Zacharioudaki M, Spentzouri D, Koutoulakou A, Kitsos-Kalyvianakis K, Chontos C, Karakonstantis S, Maraki S, Samonis G, Kofteridis DP. A Retrospective Study of *Staphylococcus aureus* Bacteremia in a Tertiary Hospital and Factors Associated with Mortality. *Diagnostics (Basel)*. 2023 Jun 5;13(11):1975. doi: 10.3390/diagnostics13111975. PMID: 37296829; PMCID: PMC10253165.

Jean-Pierre V, Boudet A, Sorlin P, Menetrey Q, Chiron R, Lavigne JP, Marchandin H. Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* in the Specific Context of Cystic Fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2022 Dec 29;24(1):597. doi: 10.3390/ijms24010597. PMID: 36614040; PMCID: PMC9820612.

Jennings MR, Elhaisouni N, Colantuoni E, Prochaska EC, Johnson J, Xiao S, Clark RH, Greenberg RG, Benjamin DK Jr, Milstone AM. Epidemiology and Mortality of Invasive *Staphylococcus aureus* Infections in Hospitalized Infants. *JAMA Pediatr.* 2025 Apr 14;179(7):747–55. doi: 10.1001/jamapediatrics.2025.0429. Epub ahead of print. PMID: 40227743; PMCID: PMC11997858.

Jia M, Mai B, Liu S, Li Z, Liu Q, Wang P. Antibacterial effect of S-Porphin sodium photodynamic therapy on *Staphylococcus aureus* and multiple drug resistance *Staphylococcus aureus*. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019 Dec;28:80-87. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.08.031. Epub 2019 Aug 27. PMID: 31470120.

Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti O, Dei D, Fantetti L, Chiti G, Roncucci G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006 Jun;38(5):468-81. doi: 10.1002/lsm.20361. PMID: 16788934.

Kallen AJ, Jernigan JA, Patel PR. Decolonization to prevent infections with *Staphylococcus aureus* in patients undergoing hemodialysis: a review of current evidence. *Semin Dial.* 2011 Sep-Oct;24(5):533-9. doi: 10.1111/j.1525-139X.2011.00959.x. Epub 2011 Aug 28. PMID: 21883469.

Krismer B, Peschel A. Does *Staphylococcus aureus* nasal colonization involve biofilm formation? *Future Microbiol.* 2011 May;6(5):489-93. doi: 10.2217/fmb.11.37. PMID: 21585258.

Krismer B, Weidenmaier C, Zipperer A, Peschel A. The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. *Nat Rev Microbiol.* 2017 Oct 12;15(11):675-687. doi: 10.1038/nrmicro.2017.104. PMID: 29021598.

Laux C, Peschel A, Krismer B. *Staphylococcus aureus* colonization of the human nose and interaction with other microbiome members. *Microbiol Spectr.* 2019;7. doi:10.1128/microbiolspec.gpp3-0029-2018

Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 1998 Aug 20;339(8):520-32. doi: 10.1056/NEJM199808203390806. PMID: 9709046.

Mandolfo S, Possenti S, De Francesco MA, Lucca B, Caruso A, Alberici F. From prevention to treatment: Comprehensive strategies for the management of *Staphylococcus aureus* induced catheter-related bloodstream infections. *J Vasc Access*. 2025 Jun 7;11297298251342301. doi: 10.1177/11297298251342301. Epub ahead of print. PMID: 40481744.

Martins WK, Santos NF, Rocha CS, Bacellar IOL, Tsubone TM, Viotto AC, Matsukuma AY, Abrantes ABP, Siani P, Dias LG, Baptista MS. Parallel damage in mitochondria and lysosomes is an efficient way to photoinduce cell death. *Autophagy*. 2019 Feb;15(2):259-279. doi: 10.1080/15548627.2018.1515609. Epub 2018 Sep 25. PMID: 30176156; PMCID: PMC6333451.

Meller DM, Hickok J, Andersen R, Loebel NG, Wilson M. Photodisinfection Therapy: Essential Technology for Infection Control. *The Infection Prevention Strategy* [Internet]. 2020; Available from: www.IC.tips

Mengistu BK, Alemayehu T, Mengesha TH, Ali MM. Nasal Colonizing Vancomycin-Resistant and Intermediate *Staphylococcus aureus* Among Admitted Patients: A Hospital Based Cross-Sectional Study. *Health Sci Rep*. 2025 Oct 7;8(10):e71323. doi: 10.1002/hsr2.71323. PMID: 41070392; PMCID: PMC12504627.

Monteiro JSC, Rangel EE, de Oliveira SCPS, Crugeira PJL, Nunes IPF, de A Fagnani SRC, Sampaio FJP, de Almeida PF, Pinheiro ALB. Enhancement of photodynamic inactivation of planktonic cultures of *Staphylococcus aureus* by DMMB-AuNPs. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020 Sep;31:101930. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101930. Epub 2020 Jul 24. PMID: 32717452.

Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers (Basel)*. 2011;3(2):2516-39. doi: 10.3390/cancers3022516. PMID: 23914299; PMCID: PMC3729395.

Muehler D, Brandl E, Hiller KA, Cieplik F, Maisch T. Membrane damage as mechanism of photodynamic inactivation using Methylene blue and TMPyP in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Photochem Photobiol Sci*. 2022 Feb;21(2):209-220. doi: 10.1007/s43630-021-00158-z. Epub 2022 Jan 21. PMID: 35061201.

Ogston A, "On Abscesses", *Reviews of Infectious Diseases*, Volume 6, Issue 1, January 1984, Pages 122–128, <https://doi.org/10.1093/clinids/6.1.122>

Okda M, Spina S, Safaee Fakhr B, Carroll RW. The antimicrobial effects of nitric oxide: A narrative review. *Nitric Oxide*. 2025 Apr;155:20-40. doi: 10.1016/j.niox.2025.01.001. Epub 2025 Jan 8. PMID: 39793728.

Palikhey A, Chaudhary SC, Mishra S, Shrestha J, Gyawali P. Multidrug Resistance among Patients with Surgical Site Infection in a Tertiary Care Centre. *JNMA J Nepal Med Assoc*. 2023 Nov 1;61(267):882-885. doi: 10.31729/jnma.8353. PMID: 38289728; PMCID: PMC10725225.

Pappa KA. The clinical development of mupirocin. *J Am Acad Dermatol*. 1990 May;22(5 Pt 1):873-9. doi: 10.1016/0190-9622(90)70116-y. PMID: 2112164.

Pérez-Laguna V, García-Luque I, Ballesta S, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, Rezusta A, Gilaberte Y. Photodynamic therapy using methylene blue, combined or not with gentamicin, against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020 Sep;31:101810. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101810. Epub 2020 May 11. PMID: 32437976.

Petrellis MC, Frigo L, Ribeiro W, Leal-Junior EC, Oliveira FR, Maria DA, Lopes-Martins RÁ. Proinflammatory effects of photoactivated methylene blue on rat model of Walker 256 carcinosarcoma. *Exp Oncol*. 2019 Jun;41(2):112-122. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-41-no-2.13047. PMID: 31262159.

Piewngam P, Otto M. *Staphylococcus aureus* colonisation and strategies for decolonisation. *Lancet Microbe*. 2024;5(6):e606–e618. doi:10.1016/S2666-5247(24)00040-5

Portais A, Gallouche M, Pavese P, Caspar Y, Bosson JL, Astagneau P, Pailhé R, Tonetti J, Duval BR, Landelle C. *Staphylococcus aureus* screening and preoperative decolonisation with Mupirocin and Chlorhexidine to reduce the risk of surgical site infections in orthopaedic surgery: a pre-post study. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2024 Jul 11;13(1):75. doi: 10.1186/s13756-024-01432-2. PMID: 38992708; PMCID: PMC11238515.

Pucelik B, Barzowska A, Sulek A, Werlos M, Dąbrowski JM. Refining antimicrobial photodynamic therapy: effect of charge distribution and central metal ion in fluorinated porphyrins on effective control of planktonic and biofilm bacterial forms. *Photochem Photobiol Sci*. 2024 Mar;23(3):539-560. doi: 10.1007/s43630-024-00538-1. Epub 2024 Mar 8. PMID: 38457119.

Rakshit T, Shenoy M S. How resistant is *Staphylococcus aureus* to the topical antibiotic mupirocin? *J Glob Antimicrob Resist*. 2017 Mar;8:102-103. doi: 10.1016/j.jgar.2016.12.002. Epub 2017 Jan 7. PMID: 28082145.

Ribeiro AP, Pavarina AC, Trindade FZ, Inada NM, Bagnato VS, de Souza Costa CA. Photodynamic therapy associating Photogem and blue LED on L929 and MDPC-23 cell culture. *Cell Biol Int*. 2010 Mar 8;34(4):343-51. doi: 10.1042/CBI20090032. PMID: 19947913.

Sakr A, Brégeon F, Mège JL, Rolain JM, Blin O. *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. *Front Microbiol*. 2018 Oct 8;9:2419. doi: 10.3389/fmicb.2018.02419. PMID: 30349525; PMCID: PMC6186810.

Sanderson AR, Leid JG, Hunsaker D. Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2006 Jul;116(7):1121-6. doi: 10.1097/01.mlg.0000221954.05467.54. PMID: 16826045.

Santos PML, Santos DP, Silva RTG, Moraes PVA, Machado SEF. Uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana em bactérias gram positivas e negativas resistentes. *Rev Eletron Estácio Recife*. 2022;8(1). Available from: <https://reer.emnuvens.com.br/reer/article/view/678>

Serrage H, Heiskanen V, Palin WM, Cooper PR, Milward MR, Hadis M, Hamblin MR. Under the spotlight: mechanisms of photobiomodulation concentrating on blue and green light. *Photochem Photobiol Sci*. 2019 Aug 1;18(8):1877-1909. doi: 10.1039/c9pp00089e. Epub 2019 Jun 11. PMID: 31183484; PMCID: PMC6685747.

Shaghayegh G, Cooksley C, Ramezanpour M, Wormald PJ, Psaltis AJ, Vreugde S. Chronic Rhinosinusitis, *S. aureus* Biofilm and Secreted Products, Inflammatory Responses, and Disease Severity. *Biomedicines*. 2022 Jun 9;10(6):1362. doi: 10.3390/biomedicines10061362. PMID: 35740385; PMCID: PMC9220248.

Shojaeian S, Asnaashari M, Heidari A, Sadeghi M, Mehrabinia P. Effect of Photodynamic Therapy With Two Different Photosensitizers on the Viability of Human Dental Pulp Stem Cells. *J Lasers Med Sci*. 2024 Dec 28;15:e70. doi: 10.34172/jlms.2024.70. PMID: 39949477; PMCID: PMC11822230.

Septimus EJ, Schweizer ML. Decolonization in Prevention of Health Care-Associated Infections. *Clin Microbiol Rev*. 2016 Apr;29(2):201-22. doi: 10.1128/CMR.00049-15. PMID: 26817630; PMCID: PMC4786886.

Silva AA, Araújo DGP, Milhomem HT, Godone RLN, Porto ALF, Canário MCAW. Infecção por *Staphylococcus aureus* em pacientes hemodialíticos: uma revisão integrativa. *Rev SeD*. 2020;14(19). Available from: <https://www.revistasuninter.com/revistasauade/index.php/saudeDesenvolvimento/article/view/1119>

Silva ES, Collina GA, Francisco CML, Silva T de O, Prates RA, Pavani C. Terapia fotodinâmica. In: *Biofotônica Conceitos e Aplicações*. 2017. p. 69–92.

Silva JGD, Boechat JP, Silva BD, Müller R, Senna JP. Monitoring *Staphylococcus aureus* nasal colonization murine model using a bioluminescent methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). *Lab Anim*. 2024 Jun;58(3):231-239. doi: 10.1177/00236772231209790. Epub 2024 Mar 9. PMID: 38460550; PMCID: PMC11264562.

Soares JM, Yakovlev VV, Blanco KC, et al. Photodynamic inactivation and its effects on the heterogeneity of bacterial resistance. *Sci Rep*. 2024;14:28268. doi:10.1038/s41598-024-79743-y

Street CN, Pedigo L, Gibbs A, Loebel NG. Antimicrobial photodynamic therapy for the decolonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the anterior nares. *Proc SPIE*. 2009;7380:73803B. doi:10.1117/12.828279

Subba A, Tsering DC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage among the critical care personnel in a tertiary care hospital in Sikkim: An observational study. *Indian J Med Res*. 2025 Jan;161(1):91-98. doi: 10.25259/IJMR_1224_2024. PMID: 40036105; PMCID: PMC11878663.

Tanu R, Chaudhary AA, Prakash G, Yasmeen N, Ali MAM, Raza N, Sharma PK, Kumar A, Yadav T, Kumar V. Exploring the potential of photodynamic therapy in overcoming multidrug resistance: mechanisms, synergies, and clinical advancements in infectious diseases. *Front Cell Infect Microbiol*. 2025 Aug 14;15:1624036. doi: 10.3389/fcimb.2025.1624036. PMID: 40895304; PMCID: PMC12391141.

Touaitia R, Mairi A, Ibrahim NA, Basher NS, Idres T, Touati A. *Staphylococcus aureus*: A Review of the Pathogenesis and Virulence Mechanisms. *Antibiotics (Basel)*. 2025 May 6;14(5):470. doi: 10.3390/antibiotics14050470. PMID: 40426537; PMCID: PMC12108373.

Troeman DPR, Hazard D, Timbermont L, Malhotra-Kumar S, van Werkhoven CH, Wolkewitz M, Ruzin A, Goossens H, Bonten MJM, Harbarth S, Sifakis F, Kluytmans JAJW; ASPIRE-SSI Study Team; Vlaeminck J, Vilken T, Xavier BB, Lammens C, van Esschoten M, Paling FP, Recanatini C, Coenjaerts F, Sellman B, Tkaczyk C, Weber S, Ekkelenkamp MB, van der Laan L, Vierhout BP, Couvé-Deacon E, David M, Chadwick D, Llewelyn MJ, Ustianowski A, Bateman A, Mawer D, Carevic B, Konstantinovic S, Djordjevic Z, Del Toro-López MD, Gallego JPH, Escudero D, Rojo MP, Torre-Cisneros J, Castelli F, Nardi G, Barbadoro P, Altmets M, Mitt P, Todor A, Bubenek-Turconi SI, Corneci D, Sandesc D, Gheorghita V, Brat R, Hanke I, Neumann J, Tomáš T, Laffut W, Van den Abeele AM. Postoperative *Staphylococcus aureus* Infections in Patients With and Without Preoperative Colonization. *JAMA Netw Open*. 2023 Oct 2;6(10):e2339793. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2023.39793. Erratum in: *JAMA Netw Open*. 2024 Mar 4;7(3):e244564. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2024.4564. PMID: 37906196; PMCID: PMC10618839.

Turchiello RF, Oliveira CS, Fernandes AU, Gómez SL, Baptista MS. Methylene blue-mediated Photodynamic Therapy in human retinoblastoma cell lines. *J Photochem Photobiol B*. 2021 Sep;222:112260. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112260. Epub 2021 Jul 16. PMID: 34304071.

Virych P, Nadтока O, Virych P, Kutsevol N. Antimicrobial photoinactivation with methylene blue of *Staphylococcus aureus*. *Mol Cryst Liq Cryst*. 2021;716(1):123–128. doi:10.1080/15421406.2020.1859702

Wang M, Cao B, Zhang K, Geng Y, Xie J, Zhang N. Fomite Transmission of Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in an Emergency Room Based on Real Touch Behaviors of Healthcare Workers and Patients. *Buildings*. 2024; 14(12):3943. <https://doi.org/10.3390/buildings14123943>

Wang R, Ghahary A, Shen YJ, Scott PG, Tredget EE. Human dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms. *J Invest Dermatol*. 1996 Mar;106(3):419-27. doi: 10.1111/1523-1747.ep12343428. PMID: 8648170.

Wang Z, Xu FJ, Yu B. Smart Polymeric Delivery System for Antitumor and Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021 Nov

4;9:783354. doi: 10.3389/fbioe.2021.783354. PMID: 34805129; PMCID: PMC8599151.

Wieland B, Gunaratnam G, Pätzold L, Wadood NA, Schmartz GP, Kundu S, Kirilov NK, Krüger I, Elhawry MI, Rehner J, Heintz H, Schmitz F, Yildiz D, Krasteva-Christ G, Becker SL, Jacobs K, Bischoff M. Assessment of the biofilm formation capacities of *Staphylococcus aureus* strains Newman and Newman D2C in vitro and in vivo. *Sci Rep.* 2025 May 8;15(1):16132. doi: 10.1038/s41598-025-00521-5. PMID: 40341159; PMCID: PMC12062259.

Yudaev P, Aleksandrova Y, Chugunova E, Neganova M. The Current State of Research in the Field of Photosensitizers and Photoactivators for Photodynamic/Photothermal Cancer Therapy: A Review. *Int J Mol Sci.* 2025 Nov 4;26(21):10733. doi: 10.3390/ijms262110733. PMID: 41226774; PMCID: PMC12609273.

Zhu T, Shi L, Yu C, Dong Y, Qiu F, Shen L, Qian Q, Zhou G, Zhu X. Ferroptosis Promotes Photodynamic Therapy: Supramolecular Photosensitizer-Inducer Nanodrug for Enhanced Cancer Treatment. *Theranostics.* 2019 May 18;9(11):3293-3307. doi: 10.7150/thno.32867. PMID: 31244955; PMCID: PMC6567978.