UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

IGOR PEREIRA RIBEIRO MUNIZ

EFETIVIDADE *in vitro* DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA MEDIADA POR PORFIRINA E CURCUMINA FRENTE A BIOFILMES DE CEPAS PADRÃO E CLINICAS DE *Acinetobacter baumannii*

Vitória da Conquista, BA
2018

IGOR PEREIRA RIBEIRO MUNIZ

EFETIVIDADE *in vitro* DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA MEDIADA POR PORFIRINA E CURCUMINA FRENTE A BIOFILMES DE CEPAS PADRÃO E CLINICAS DE *Acinetobacter baumannii*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Prof.ª Dr. Luciano Pereira Rosa

Universidade Federal da Bahia – UFBA

Co-orientadora: Prof. Drª Francine Cristina Silva Rosa

Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista, BA

2018

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

Muniz, Igor Pereira Ribeiro
Efetividade *in vitro* de diferentes protocolos e terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por porfirina e curcumina frente a biofilmes de cepas padrão e clinicas de *Acinetobacter baumannii* / Cláudia Silva Souza. - 2018.
78 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Pereira Rosa.
Co-orientadora: Profª. Drª. Francine Cristina Silva Rosa.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociência, 2018.

1. Infecção Hospitalar. 2. *Acinetobacter Baumannii*. 3. Terapia Fotodinâmica. Universidade Federal da Bahia. Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Rosa, Luciano Pereira. III. Rosa, Francine Cristina Silva. IV. Título.

Igor Pereira Ribeiro Muniz

EFETIVIDADE *in vitro* DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA MEDIADA POR PORFIRINA E CURCUMINA FRENTE A BIOFILMES DE CEPAS PADRÃO E CLINICAS DE *Acinetobacter baumannii*

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia.
Vitória da Conquista – BA, data.

_____
Prof. Dr. Luciano Pereira Rosa (Orientador)

Universidade Federal da Bahia

_____
Prof.ª Dr. Fabricio Freire de Melo (Examinador)

Universidade Federal da Bahia

_____
Prof. Drª. Milena Soares do Santos (Examinadora)

Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, eu agradeço principalmente a Deus. Ele que sempre esteve ao meu lado de diversas maneiras, nos bons e nos maus momentos, sendo sempre a minha fonte de forças para a superação de todos os limites. Agradeço também, com todo o meu coração, aos meu pais: Marli e Valdir, e ao meu irmão Ícaro, por me apoiarem desenfreadamente desde a primeira memória que consigo ter em vida. Digo um muito obrigado à Elisa, minha companheira, mulher e amiga de todas as horas, por me mostrar que a força que precisamos para superar os principais obstáculos, pode estar nas coisas mais singelas da vida. Ao meu orientador Luciano e minha co-orientadora Francine, muito obrigado por tudo! Por sempre estarem presentes em todos os momentos que acontecerem ao desenrolar dessa história escrita neste mestrado, muito obrigado! Às alunas de iniciação cientificam, Ana Meirellen e Ângela Luisa, muito obrigado! Muito obrigado por estarem todos os dias ao meu lado, no laboratório de microbiologia do instituto, dando o máximo de si até o final da construção deste trabalho. Um agradecimento especial para Janeide, a técnica do laboratório em microbiologia, por sempre estar disposta a ajudar, a providenciar materiais que eram imprescindíveis para a realização desse trabalho. Aos meus amigos que estiveram por toda a vida ao meu lado e aos que ganhei no desenrolar desse mestrado, em especial a Deivison e Ângela, que se tornaram meus irmãos, muito bom contar com vocês!

RESUMO

Atualmente, um dos principais problemas relacionado a saúde pública é a grande incidência de infecções hospitalares. Estas infecções representam uma das principais situações de aleitamento com altos índices de mortalidade e morbidade. Os indivíduos encontrados nessa condição geralmente estão hospitalizados em centros de tratamento intensivo (CTI) e unidades de tratamento intensivo (UTI). Existem condições, como por exemplo, imunodepressão ou a existência de doenças crônicas, que se apresentam como fatores de risco para infecção dos indivíduos hospitalizados. Um dos principais patógenos causadores de infecções hospitalares é uma bactéria chamada de *Acinetobacter baumannii*. *A. baumannii* é uma bactéria gram-negativa, pleomórfica, que tem sido atualmente considerada como um dos principais patógenos causadores de infecções hospitalares. Além de serem grandes causadoras de infecções, existem cepas desta espécie com ampla resistência a antibioticoterapia, o que dificulta o controle deste patógeno. Além da resistência a antibióticos, *A. baumannii* é uma bactéria formadora de biofilme. O biofilme é uma estrutura que fixa a bactéria em estruturas abióticas e bióticas e dificulta a retirada do microrganismo do ambiente. Este aparato bacteriano está associado com diversas infecções no ambiente hospitalar, sendo formado em estruturas como cateteres e em aparelhos de ventilação mecânica, que, quando em contato com um indivíduo vulnerável, poderá gerar um quadro de infecção. Estudos apontam o desenvolvimento de técnicas que consigam ao menos auxiliar a antibioticoterapia no controle de microrganismos resistentes a antibióticos. A terapia fotodinâmica (PDT) é uma dessas técnicas. A PDT é uma técnica não-tóxica que se baseia na ativação de compostos pela luz. Esses compostos são chamados de fotossensibilizantes, que, quando ativados pela luz, irão produzir moléculas reativas, como espécies reativas de oxigênio e oxigênio singleto que promovem a morte dos microrganismos. Para a realização deste trabalho foram utilizados dois fotossensibilizantes, a porfirina e a curcumina. Cepas de *A. baumannii* foram quantificadas por espectrofotometria e então cultivadas em meio caldo BHI. As cepas bacterianas cresceram neste meio durante 7 dias utilizando como suporte, para formação do biofilme, corpos de prova de resina acrílica. Após formação do biofilme, os corpos de prova foram separados em grupos sensibilizados com curcumina ou porfirina. Para o uso da curcumina foram utilizadas três diferentes concentrações (5 µg/mL; 20 µg/mL; 40 µg/mL). Para o uso da porfirina, foram utilizadas três concentrações (5 µg/mL; 20 µg/mL; 40 µg/mL). Após a sensibilização dos biofilmes com os fotossensibilizantes, foi realizada a PDT. Foi utilizado iluminação por luz do tipo LED azul (460 nm) para ativação da curcumina, onde três diferentes doses de luz foram usadas (3,24 J/cm²; 5,4 J/cm² e 10,8 J/cm²). Para ativação da porfirina foi utilizada luz do tipo LED vermelha (630nm), onde três doses diferentes de luz foram usadas (2,16 J/cm²; 3,6 J/cm² e

7,2 J/cm²). Após a realização da PDT os corpos de prova foram transferidos para eppendorfs contendo salina e então foram agitados durante um minuto. A solução do eppendorf foi transferida e cultivada em meio ágar BHI. Após o crescimento, as colônias foram contadas em contador de colônia para verificar eficiência antimicrobiana dos protocolos testados O melhor protocolo de PDT par cada fotossensibilizante foi escolhido e aplicado em outras três cepas clinicas de *A. baumannii*. Todos protocolos de PDT utilizando a porfirina foram eficientes na redução da carga bacteriana do biofilme formado por *A. baumannii*, onde, o protocolo utilizando a porfirina a 5 µg/mL ativado pela dose de 2,16 J/cm² de luz do tipo LED vermelha, foi a mais eficiente. Para os protocolos de PDT utilizando a curcumina, a maioria dos grupos testados reduziram de forma significativa a carga bacteriana do biofilme de *A. baumannii*, onde, o protocolo utilizando curcumina a 40 µg/mL, ativado pela dose de 10,8 J/cm² de luz do tipo LED azul, foi a mais eficiente na redução da carga bacteriana. Os protocolos de PDT com ação antibacteriana mais eficiente, tanto para porfirina como curcumina, reduziram de forma eficiente a carga bacteriana das cepas clinicas testadas. Os resultados apresentados por este trabalho mostram que a PDT foi eficiente na redução da carga bacteriana do biofilme formado por *A. baumannii*, obtendo significativa ação antibacteriana, mostrando que, os melhores protocolos podem ser utilizados no âmbito clinico, já que foram eficientes no controle de microrganismos circulantes desse ambiente.

Palavras chaves: Infecção hospitalar; Biofilm ;Acinetobacter baumannii ;Terapia fotodinâmica; Curcumina; Porfirina

ABSTRACT

Currently, one of the main public health problems is the high incidence of hospital infections. These infections are one of the main causes of hospitalization with high mortality and morbidity rates. Individuals with hospital infection are usually hospitalized in intensive care centers (ICUs). Conditions such as immunosuppression or the existence of chronic diseases are considered risk factors for infection of hospitalized individuals. One of the major pathogens that cause hospital infections is a bacterium called *Acinetobacter baumannii. A. baumannii* is a gram-negative, pleomorphic bacterium, which has been currently considered as a major pathogen causing nosocomial infections. Besides being an important cause of infections, this pathogen have strains with broad resistance to antibiotics, which difficult the control of these infections. In addition to antibiotic resistance, *A. baumannii* is a biofilm producer. Biofilm is a structure that attaches the bacteria to abiotic and biotic structures and makes it difficult to remove the microorganism from the environment, mainly in hospital environment. This mechanism is associated with several infections in the hospital environment, being formed in structures such as catheters and mechanical ventilation devices, which, in contact with a vulnerable individual, could generate an infection. Several studies indicate the development of techniques that can at least aid antibiotic therapy in the control of infections caused by antibiotic resistant pathogens. Photodynamic therapy (PDT) is one of these possible techniques. PDT is a non-toxic technique that depend on the activation of specific compounds by light. These compounds are called photosensitizers, which, when activated by light, will produce reactive molecules, such as reactive oxygen species and singlet oxygen that promote the death of microorganisms. Two photosensitizers, porphyrin and curcumin, were used to perform this work. Strains of *A. baumannii* were quantified by spectrophotometry and then cultured in BHI broth medium. The bacterial strains were grown in this medium during 7 days in contact with acrylic resin specimens, which were used as support for biofilm formation. The specimens were separated into groups sensitized with curcumin at three different concentrations (5 µg/mL; 20 µg/mL; 40 µg/mL). Another part of specimens was sensitized by porphyrin in three concentrations (5 µg/mL; 20 µg/mL; 40 µg/mL). After sensitization, the PDT was performed, using blue LED light (460 nm) to activate curcumin, receiving three different light doses (3,24 J/cm²; 5,4 J/cm² e 10,8 J/cm²) and for the activation of porphyrin was used red LED light (630nm) receiving three different light doses (2,16 J/cm²; 3,6 J/cm² e 7,2 J/cm²). After PDT, the specimens were transferred to

eppendorfs containing saline and were agitated during one minute. The solution was transferred and cultured in BHI agar medium. After growth, the colonies were counted in order to verify the efficiencies of the protocols tested. The best protocol for each photosensitizer was chosen and then was applied in three other clinical strains of *A. baumannii*. All PDT protocols using porphyrin were efficient in reducing the bacterial load of the biofilm formed by *A. baumannii.* The protocol using 5 µg/mL of porphyrin activated by the dose of 2.16 J/cm² red LED light was the most efficient. For the PDT protocols using curcumin, most of the tested groups significantly reduced the bacterial load of the *A. baumannii* biofilm. The protocol using curcumin at 40 µg/mL activated by the dose of 10.8 J/cm² of blue LED type light was the most efficient. The most efficient antibacterial PDT protocols for both photosensitizers, porphyrin and curcumin, efficiently reduced the bacterial load of the clinical strains tested. The results presented by this work show that PDT was efficient in reducing the bacterial load of the *A. baumannii* biofilm, obtaining a significant antibacterial action, showing that the best protocols can be used in the clinical ambit, since they were efficient in the control of circulating micro-organisms from this environment.

Key words: Hospital infection; Photodynamic therapy; Biofilm; *Acinetobacter baumannii*; Curcumin; Porphyrin

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 10
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO 12
2.1 Infecções em ambiente hospitalar e consequências para o sistema público de saúde e a sociedade 12
***2.2 Acinetobacter baumannii* 13**
2.3 O grande desafio do controle de bactérias resistentes a antibióticos 14
2.4 Biofilme, uma forma adicional de sobrevivência bacteriana 16
2.5 A luz como uma nova perspectiva no combate de bactérias patogênicas 18
2.6 Mecanismos de ação da Terapia fotodinâmica 19
3. METODOLOGIA DESCRITIVA 20
3.1 Preparo de corpo de prova 20
3.2 Ativação bacteriana 20
3.3 Cultivo bacteriano e formação do biofilme 21
3.4 Preparo dos fotossensibilizantes 22
3.5 Grupos experimentais 23
3.6 Parâmetros aplicados na terapia fotodinâmica 24
3.7 Condições experimentais 24
3.8 Avaliação da efetividade da terapia fotodinâmica em isolados clinicos de *A. baumannii* 26
3.9 Análise estatística 26
4. CAPITULO 1 38
5. CAPITULO 2 61

1. INTRODUÇÃO

As infecções hospitalares representam um grande problema dentro do sistema de saúde pública no mundo todo. Essas infecções são uma das principais causas de morbidade e mortalidade no ambiente hospitalar, assim, causando significativo prejuízo social e econômico. Diversos fatores de riscos estão associados ao acontecimento dessas infecções.

Na atualidade, o tratamento dessas infecções enfrenta muitas dificuldades devido a existência de mecanismos de resistência às terapias antimicrobianas disponíveis. Além da resistência antimicrobiana, estes patógenos bacterianos possuem vasta gama de mecanismos de virulência que auxiliam na persistência destes patógenos no ambiente hospitalar.

Um destes mecanismos de persistência bacteriana é a produção de polímeros para formar uma estrutura chamada de biofilme. Esta ferramenta bacteriana é uma estrutura formada por substâncias extracelulares poliméricas, nomeadas de polissacarídeos extracelulares (EPS). O biofilme, através de suas propriedades, consegue proteger as bactérias da ação de antibióticos, como também, dificultar a eliminação desses microrganismos de diversos ambientes, como por exemplo, o ambiente hospitalar.

As bactérias conseguem produzir o biofilme tanto em estruturas bióticas como abióticas, tais como cateteres, equipamentos de ventilação mecânica, o que facilita o acesso a indivíduos comprometidos, assim, aumentando de forma drástica os índices de infeções em unidades de terapia intensiva e centros de terapia intensivo.

Dentre os possíveis patógenos causadores dessas infecções, está situada a bactéria da espécie *Acinetobacter baumannii*. *A. baumannii* é um patógeno oportunista, se caracterizando por ser um microrganismo pleomorfico, também chamado de coccobacillus, pertencente à classe das bactérias gram-negativas.

Este microrganismo é capaz de causar diversos tipos de quadros clínicos, tais como pneumonia, meningite, infecções na corrente sanguínea, infecções na

pele e infecções urinárias. *A. baumannii* tem sido significantemente responsável por causar grande parte das infecções hospitalares.

Além de ser um patógeno com grande incidência no que se diz a infecções hospitalares, esta espécie impõe dificuldades em seu controle por possuir cepas multi-resistentes e extensivamente-resistentes a antibióticos, além da formação de biofilme. Nesse sentido, a necessidade do desenvolvimento de novos antibióticos ou de novas estratégias que venham auxiliar a antibioticoterapia e sanitização dos ambientes hospitalares se veem necessárias.

Muitas civilizações antigas, tais como os povos gregos, chineses e egípcios fizeram o uso da luz do sol para o tratamento de diversas condições clinicas. Trabalhos atuais têm verificado a ação da luz em tratamentos de doenças como o câncer e também no controle de microrganismos. Uma das técnicas que tem sido apontada como promissora é a terapia fotodinâmica. O primeiro relato desse evento foi dado em 1900 por Oscar Raab, que observou a morte de parasitas do gênero *Paramecium spp.* quando expostos a luz de relâmpagos.

A terapia fotodinâmica é uma técnica não-tóxica que se baseia na ativação de compostos pela luz. Esses compostos são chamados de fotossensibilizantes, que, quando ativados pela luz, irão produzir moléculas reativas, como espécies reativas de oxigênio e oxigênio singleto. Quando em contato com células, como por exemplo células bacterianas, essas moléculas promoverão a morte dos microrganismos.

Dentre a gama de fotossensibilizantes disponíveis comercialmente estão o Photofrin ®, um composto de estrutura derivado da hematoporfirina, e a Curcumina, um composto derivado da *Curcuma longa*, também conhecido como açafrão-da-india. Neste trabalho foram testados diversos protocolos de terapia fotodinâmica utilizando o Photofrin® e a Curcumina como fotossensibilizantes, sendo ativados por luzes do tipo LED (Light Emmiting Diodes) com comprimento de onda de 630 nm (Luz vermelha) e 450 nm (Luz azul) respectivamente.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Infecções em ambiente hospitalar e consequências para o sistema público de saúde e a sociedade

As Infecções Hospitalares são um problema de saúde pública, sendo uma das principais causas responsáveis pelos altos índices de morbidade e mortalidade no mundo todo. Além de afetarem a saúde dos indivíduos de maneira direta, causa significativo prejuízo social, emocional e econômico tanto para os pacientes e familiares, além de custos para o Sistema Público de Saúde (MACHADO; CARVALHO; OLIVEIRA, 2011).

A definição oficial de infecção hospitalar no Brasil, foi determinada a partir da Portaria GM/MS nº 2.616 de 1998:

> Anexo II - Conceitos e Critérios Diagnósticos das Infecções Hospitalares (...)
>
> 1.2. Infecção hospitalar (IH):
>
> 1.2.1. é aquela adquirida após a admissão do paciente e que se manifeste durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares (...)
>
> 2.2.2. quando se desconhecer o período de incubação do microrganismo e não houver evidência clínica e/ou dado laboratorial de infecção no momento da internação, convenciona-se infecção hospitalar toda manifestação clínica de infecção que se apresentar a partir de 72 (setenta e duas) horas após a admissão;
>
> 2.2.3. (...) aquelas manifestadas antes de 72 (setenta e duas) horas da internação, quando associadas a procedimentos diagnósticos e/ou terapêuticos, realizados durante este período. (BRASIL, 1998).

Diversos fatores estão associados ao risco de contrair infecção por patógenos no ambiente hospitalar, como internação em Centros de Tratamentos

Intensivo (CTI) e Unidades de Tratamento Intensivo (UTI). O uso de equipamentos (Cateteres, aparelhos de ventilação mecânica, entre outros) colonizados por microrganismos formadores de biofilme associado a presença de indivíduos com fatores de risco como fibrose cística, queimaduras e situações de imunocomprometimento e imunodeficiências aumentam a chance da ocorrência de infecções hospitalares (MACHADO; CARVALHO; OLIVEIRA, 2011; OWLIA et al., 2012; HUSE et al., 2013; ALP et al., 2017; MENEGUETI et al., 2017; CEREZALES et al., 2018; SKRZAT-KLAPACZYŃSKA et al., 2018)

Tais infecções, na maioria das vezes, estão intimamente ligadas a processos invasivos tanto para o tratamento quanto para o diagnóstico. Outro agravante importante reside no fato de que as infecções hospitalares favorecem a seleção de patógenos com multirresistência a antibióticos dificultando o tratamento (SOUZA et al., 2015; QIN et al., 2018).

Múltiplos patógenos são os possíveis causadores destas infecções, podendo elas serem de diversas origens microbianas, como fungos e bactérias (BORG et al., 2009; PAIVA; MERGULHÃO; PEREIRA, 2018; QIN et al., 2018). Bactérias gram-negativas são importantes patógenos causadores de infecções hospitalares. Em CTI's pediátricas e neonatais, essa classe de bactérias é responsável por causar de 24 % e ≥ 54 % respectivamente (BEREZIN; SOLÓRZANO, 2014).

2.2 Acinetobacter baumannii

A.baumannii é um microrganismo pertencente a classe das bactérias gram-negativas e se caracteriza por ser pleomorfico, também chamado de coccobacillus. Possui metabolismo aeróbio estrito, imóvel, catalase positiva e oxidase negativa e cresce em meios laboratoriais não-seletivos (APARECIDA; NEVES, 2012; TOWNSEND et al., 2015).

Ao longo dos últimos anos, o gênero *Acinetobacter spp.* tem sofrido uma constante modificação quanto a sua classificação. Este gênero é um dos membros da família *Moraxellaceae* e também faz parte da ordem *Pseudomonadales* (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). São microrganismos saprófitas ubíquos, encontrados na natureza e no ambiente hospitalar a capazes

de sobreviver em superfícies úmidas, como equipamentos de ventilação mecânica (PATRICK R.; KEN S.; MICHAEL A., 2014).

O gênero *Acinetobacter spp.* se divide em dois grupos principais: os que oxidam glicose, onde está situada a espécie *A. baumannii*, e os que não oxidam glicose, tais como as espécies *A.lowffii* e *A. haemolyticus* (PATRICK R.; KEN S.; MICHAEL A., 2014). *A. baumannii* é considerado um patógeno oportunista, ou seja, em condições de saúde estável do indivíduo, a mesma pode colonizar o indivíduo, mas não causa uma infecção (OWLIA et al., 2012).

Esta espécie é relacionada por causar infecções no trato urinário, feridas, como queimaduras e infecções no trato respiratório, sendo um dos principais patógenos responsáveis por causar o quadro de pneumonia. Além desses quadros clínicos, este patógeno também causa infecções em tecidos moles e meningite (ESPINAL; MARTÍ; VILA, 2012; PATRICK R.; KEN S.; MICHAEL A., 2014; VIJAYAKUMAR et al., 2016).

A. baumannii é a espécie mais frequentemente isolada dentro do seu gênero, representando mais de 90% das cepas isoladas causadoras de infecções. Além de ser a maior representante do gênero, é uma das espécies bacterianas que apresenta maior resistência aos agentes antimicrobianos usados na medicina (TOWNER, 2009).

Dentro da classe das bactéria gram-negativa, *A. baumannii* tem ganhado grande atenção nos últimos anos, isto devido ao fato deste patógeno ter se tornado um dos principais causadores de infecções hospitalares (DEVECI et al., 2013; METAN et al., 2014; ALP et al., 2017). Um dos principais problemas no controle deste patógeno é existência de cepas multi-resistentes a antibióticos além de ser uma espécie com cepas formadoras de biofilme (OWLIA et al., 2012).

2.3 O grande desafio do controle de bactérias resistentes a antibióticos

Atualmente, um dos maiores problemas da medicina, quando se trata do controle de infecções, é a capacidade que diversos patógenos possuem de evasão da ação de substâncias antibióticas, o que gera cepas resistentes a

esses agentes. Essa dificuldade no tratamento surgiu devido ao mal-uso desses fármacos ao longo do tempo, como o seu uso exacerbado, uso da terapia por menos tempo do que o indicado e também o uso de antibióticos sem indicações médicas. De forma conjunta, esses fatores facilitaram a seleção de cepas com resistência a diversas classes de antibióticos entre as populações bacterianas (ECE et al., 2014).

Quando bactérias apresentam resistência a pelo menos uma classe de antibióticos, estes são denominadas de cepas multirresistentes a antibióticos (MRA), e quando são resistentes a mais de uma classe de antibióticos passam a ser denominadas de cepas extremamente resistentes a antibióticos (ERA) (DEVECI et al., 2013; METAN et al., 2014; CEREZALES et al., 2018).

Metan e colaboradores (2014), estudaram índices de contaminação em centros de hematologia na Turquia, e então verificaram que *A. baumannii* chegou a ser responsável por causar 90 % das infecções nesses locais. Além da alta incidência, as cepas identificadas eram multirresistentes a diversas classes de antibióticos e foram responsáveis por alta taxa de mortalidade, tendo cerca de 82 %.

Atualmente, a classe de antibióticos mais utilizada para o tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* são substâncias pertencentes a classes dos antibióticos carbapenemicos. Outro antibiótico utilizado para o controle de bactérias gram-negativas, tais como *A. baumannii* é a colistina, também conhecido como Polimixina E. Entretanto, já existem diversas cepas de *A. baumannii* espalhadas pelo mundo que apresentam resistência a essas duas classes de antibióticos (OWLIA et al., 2012; JORGE; SILVA; DOMINGUES, 2016; YANG et al., 2018).

Além da dificuldade do uso de antibióticos devido a sensibilidade dos microrganismos patogênicos aos mesmos, essas substâncias podem gerar efeitos colaterais prejudiciais aos organismos. A colistina por exemplo é relacionada por causar efeitos neurotóxicos e nefrotóxicos (ZINNE et al., 2018), e os carbapenemicos estão associados com toxicidade no sistema nervoso central e convulsões (CANNON et al., 2014), assim necessitando do desenvolvimento de novas estratégias que auxiliem o uso de antibióticos. (YANG et al., 2018),

As bactérias, além da ampla resistência a antibióticos desenvolvida nos últimos anos, lançam mão de outras ferramentas, como mecanismos de virulência. Dentre estes mecanismos de virulência, uma ferramenta importante para algumas bactérias, e que representam um grande problema, principalmente no ambiente hospitalar, é a capacidade da formação de biofilme.

2.4 Biofilme, uma forma adicional de sobrevivência bacteriana

Estudos clínicos mostram que infecções causadas por *A. baumannii* tem tido altos índices de incidência e de mortalidade dos indivíduos infectados (CHAARI et al., 2013). A persistência desses patógenos no ambiente hospitalar pode ser associado a produção de fatores de virulência, tais como a formação de biofilmes, situação que é relatada em diversos trabalhos científicos, aumentando a incidência de infecções hospitalares (ESPINAL; MARTÍ; VILA, 2012; HALILOGLU et al., 2016; YEO et al., 2018).

O biofilme é uma estrutura que tem como objetivo proteger os microrganismos da ação de agentes que possam danifica-los. O estimulo para a formação do biofilme pode ser dado em resposta a exposição de mínimas concentrações de antibióticos, deficiências nutricionais no meio no qual está presente e também em reação a sinais do hospedeiro (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018; SATO et al., 2018).

Os biofilmes são estruturas na quais as bactérias são cobertas por substâncias, produzidas pelas mesmas, chamadas de substâncias extracelulares poliméricas, também conhecidas por EPS (Extracellular polymeric substances). Os EPS's produzidos recobrem as camadas de bactérias, protegendo-as e proporcionando adesão umas às outras e também a superfícies (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018).

Para a formação do biofilme, células bacterianas irão se aderir em uma superfície de maneira reversível e começam a se multiplicar. Após aumentar a população bacteriana, essas células, que agora formam micro-colônias, se aderem de maneira irreversível à superfície. Após se ligar irreversivelmente à superfície, as bactérias irão aumentar a sua população, formando grupos

maiores, que irão se arranjar em camadas e irão produzir os EPS's para formar a matriz extracelular do biofilme (SOTO, 2015).

Após a maturação das células, que estão crescendo no biofilme, essas células planctónicas, que são bactérias desprendidas do biofilme, dentro do biofilme, irão se separar do mesmo e dispersar-se pelo ambiente, podendo se estabelecer e formar biofilme em outros locais(SOTO, 2015).

A comunicação realizada entre as células tanto para o início da produção do biofilme quanto para a produção dos EPS's, é feita através de um mecanismo de comunicação, chamado de quórum sensing. O quórum sensing é um mecanismo no qual a bactéria produz, reconhece e responde à certas moléculas, chamadas de autoindutoras (LI; TIAN, 2016). A resposta que as bactérias emitem são geradas através da ativação de genes específicos para a formação do biofilme, o que faz com que elas ajam de maneira coordenada (NICOL et al., 2018).

O biofilme, através de sua estrutura, consegue proteger as bactérias de antibióticos e desinfetantes através de diversos mecanismos. Entre esses mecanismos têm-se a impermeabilidade da matriz do biofilme quanto a agentes bactericidas. As células presentes no biofilme também possuem taxa de crescimento diminuído devido à quantidade de nutrientes disponível e também de oxigênio, tendo uma manutenção desses microrganismos (KARATAN; WATNICK, 2009).

Outro interessante mecanismo é a modificada expressão genética dessas células, produzindo mecanismos de bombas de efluxo de antibióticos, onde o agente bactericida entra na célula bacteriana, mas a célula devolve o antibiótico para o meio, antes do mesmo conseguir ter o seu efeito (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018).

A capacidade de formar biofilme por *A. baumannii* em superfícies bióticas e abióticas, como em equipamentos utilizados no ambiente hospitalar para tratamentos, é a principal explicação para a persistência desses microrganismos em locais como UTI's e CTI's (RAMANATHAN et al., 2018).

Estudos como o de Yeo e colaboradores (2018), mostraram a formação de biofilmes em cateteres utilizados em membranas extracorpóreas de oxigenação (MECO), utilizadas no tratamento de indivíduos com problemas cardíacos e respiratórios. Este estudo apontou que o microrganismo que mais

foi responsável pela formação desses biofilmes foi uma cepa da espécie *A.baumannii* resistente a carbapenem, presente em 56,3 % das amostras.

Outros estudos ainda apontam *A. baumannii* como um grande patógeno causador de doenças no ambiente hospitalar. Em um hospital no iraque, no total de 112 amostras coletadas de equipamentos da ala hospitalar, foi detectado que 21 das mesmas continham *A. baumannii* (AL-KADMY et al., 2018).

2.5 A luz como uma nova perspectiva no combate de bactérias patogênicas

Na atualidade, técnicas que utilizam a luz tem se destacado cada vez mais, sendo aplicadas na prática clínica diária e também como técnica de diagnóstico clinico. Tais procedimentos são resultado do desenvolvimento de novas técnicas e aparatos que utilizem a luz, tais como o advento do LED (*Light Emitting Diode*), que se destaca como uma tecnologia de qualidade e menos custosa (SHACKLEY et al., 1999).

Os primeiros usos da luz como terapêutica se deram a muitos séculos atrás, por povos como egípcios, chineses e indianos, onde, um dos primeiros registros se deu na Grécia, a mais de 3000 anos atrás. Entretanto, no início dos anos 1900's, Oscar Raab em seu experimento, notou que a luz foi capaz de provocar a morte de protozoários do gênero *Paramecium spp.*(DANIELL; HILL, 1991). Essa descoberta de Raab deu início a uma técnica e estratégia que foi nomeada por Von Tappeiner, no ano de 1904, conhecida nos dias de hoje como Terapia fotodinâmica (PDT)(KALKA; MERK; MUKHTAR, 2009).

A PDT utiliza irradiação luminosa de lasers ou LEDs associada a corantes fotossensibilizantes para promover a morte não tóxica de microrganismos (PRAZMO et al., 2016). A PDT usa a combinação de fotossensibilizantes não tóxicos, luzes no espectro visível, que combinadas na presença de oxigênio, gera espécies reativas de oxigênio ou transferência de elétrons do fotossensibilizante para a estrutura celular alvo. Tais eventos acabam gerando a morte célular não tóxica (DAI et al., 2009).

O fotossensibilizante, um dos principais componentes da PDT, possui algumas características que são de extrema importância para o seu uso na técnica. A pureza química, a capacidade de ser absorvida por células alvo, meia

vida curta, ser eliminada rapidamente do tecido saudável e também absorver comprimentos de onda com ótima penetração no local alvo (KALKA; MERK; MUKHTAR, 2009), seja ele um tecido tumoral ou uma célula bacteriana.

Para o tratamento de doenças como o câncer, muitos países já possuem em suas legislações a aprovação do uso de alguns fotossensibilizantes, o Photofrin®, o Foscan® , o Photogem®, o ácido 5-aminolevulinico (ALA), onde todos possuem em sua estrutura anéis porfirinicos (PRAZMO et al., 2016; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2018)..

Diversos outros fotossensibilizantes têm sido utilizados em pesquisa, não só para o tratamento de câncer, mas também no controle de patógenos. Dentre os fotossensibilizantes utilizados para estes fins, estão o azul de metileno, azul de toluidina, eritrosina, cristal de violeta (HUANG et al., 2012), entre outros, como por exemplo a curcumina.

A curcumina é um composto fenólico, membro da família cucuminoide, que é derivado da *Curcuma longa*, também conhecido como Açafrão-da-Índia. A curcumina possui grande potencial medicinal para aplicação, devido ao fato dela ter atividade anti-inflamatória, anti-septica, anti-viral e anti-tumoral (ALI; BANERJEA, 2016; SÖKMEN; AKRAM KHAN, 2016; TSAI et al., 2018). Este composto se mostra como um bom fotossensibilizante por absorver luz no espectro visível do azul (ALMEIDA et al., 2017; SANTEZI; REINA; DOVIGO, 2018).

A PDT, que foi inicialmente observada nos experimentos com o *Paramecium spp.*, retornou a ser explorada nos últimos anos, onde vários estudos têm feito o uso dessa tecnologia. Essa técnica vem sendo apontada para auxiliar o tratamento infecções e desinfecções de ambientes, podendo ser uma ferramenta auxiliar para o combate do problema decorrente da resistência antimicrobiana. Esta terapia tem sido denominada Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) (CHINIFORUSH et al., 2016; FILA et al., 2016; WINKLER et al., 2016).

2.6 Mecanismos de ação da Terapia fotodinâmica

Como dito acima, existem dois possíveis tipos de reações desencadeadas pela PDT, a reação de tipo I e a do tipo II. Inicialmente, o fotossensibilizante

quando energizado pela luz, em comprimento de onda especifico para absorção, irá passar de um estado desenergizado, para um estado singleto energizado. Essa energia irá se dispersar através de um processo de fluorescência, ou, pode continuar a se energizar, pulando de um estado singleto para o tripleto (PRAZMO et al., 2016).

A reação de tipo I ocorre a partir da interação entre o fotossensibilizante em seu estado tripleto com a estrutura alvo, por exemplo, uma membrana celular. Ao decorrer dessa interação, elétrons ou moléculas de hidrogênio são retirados das moléculas para formar radicais livres. Os radicais irão então reagir com o oxigênio para produzir espécies altamente reativas de oxigênio como superóxido e radicais hidroxil, que são agressivos para a estrutura celular (PRAZMO et al., 2016).

Quanto a reação do tipo II, é uma reação que ocorre diretamente com o oxigênio. O fotossensibilizante em seu estado tripleto passará a sua energia para o oxigênio tripleto em seu estado basal, o que irá produzir o oxigênio singleto, que é uma espécie reativa de oxigênio (HUANG et al., 2017).

3. METODOLOGIA DESCRITIVA

3.1 Preparo de corpo de prova

Foram confeccionadas estruturas chamadas de “corpo de prova” para servir como suporte para a formação da estrutura do biofilme pelas bactérias utilizadas nesse experimento. Para a confecção do corpo de prova, foi utilizada resina acrílica ativada quimicamente (RAAQ) (TDV Dental Ltda. Pomerode, SC, Brasil). Em um recipiente de vidro, foi adicionado o pó da resina e a solução polimerizante, como indicado pelo fabricante para a formação da massa de resina acrilica. A massa foi transferida para uma placa de gesso, com moldes de em formatos de discos contendo altura de aproximadamente 5mm e diâmetro de de 6,4 mm. Após a secagem, os discos de resina foram retirados e então autoclavados para o uso no procedimento experimental.

3.2 Ativação bacteriana

As cepas de *A. baumannii* utilizadas no trabalho foram doadas pelas Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Foi realizado um primeiro cultivo de cada cepa bacteriana, em meio caldo BHI (Himedia Laboratories PVT. Limited, Mumbai, India), para ativação dessas bactérias, para então serem utilizadas posteriormente no procedimento experimental. Dentre as cepas bacterianas, foi utilizada uma cepa ATCC 19606 e três cepas isoladas de amostras clinicas, que foram CCBH24267, CCBH24360 e CCBH24383. Cada uma dessas cepas foi transferida para tubos de ensaio com rosca contendo 3 ml de caldo BHI, durante um período de 24 horas para crescimento, em estufa B.O.D na temperatura de 35ºC-37ºC. Após a ativação, foram semeadas alíquotas das cepas bacterianas em placas contendo meio Ágar BHI (Himedia Laboratories PVT. Limited, Mumbai, India) para crescimento durante 24 em estufa B.O.D na temperatura de 35ºC-37ºC, para isolamento das colônias.

Após o crescimento bacteriano sobre a placa, com o auxílio de uma alça bacteriológica, as unidades formadoras de colônias (UFC'S) foram transferidas da placa para eppendorfs contendo solução contendo Caldo BHI e glicerol a 15%. Após a transferência das bactérias para os eppendorfs, os mesmos foram estocados e armazenados em freezer a -20ºC para posterior uso das mesmas ao decorrer do experimento.

3.3 Cultivo bacteriano e formação do biofilme

Para o cultivo bacteriano, foram utilizadas as cepas de *A. baumannii* descritas anteriormente. A cada ciclo do experimento, a cepa utilizada foi reativada. Para o processo de reativação, foi utilizado o meio ágar BHI em placas de petri, durante 24 horas em estufa B.O.D com temperatura variante de 35ºC-37ºC.

Após o crescimento bacteriano, a bactéria foi coletada e quantificada em espectrofotômetro Spectrum SP 2000 UV (Dubai – Emirados Árabes), para a obtenção de 5 x 10^6 UFC's de *A. baumannii*. Para a quantificação, colônias de bactérias crescidas no meio BHI foram coletadas, em fluxo laminar, com o uso de alça bacteriológica. Com a alça bacteriológica, transferiu-se as colônias para tubos de ensaio com rosca contendo solução salina. Os tubos foram submetidos a agitação, até a total dissolução do material biológico na solução salina.

Dentro do fluxo laminar, foram retiradas alíquotas de 2 ml e transferidas para cubetas de quartzo para leitura em espectrofotômetro. Outra cubeta de quartzo foi preenchida com 2 ml de solução salina, para ser utilizada como branco na experimentação. O espectrofotômetro foi configurado para emitir luz com comprimento de onda de 590 nm. Quando a solução atingiu 0,118 ± 0,020 de absorbância, significou que a concentração de unidades formadores de colônias de *A. baumannii* foi encontrada.

Após a quantificação bacteriana, foi iniciada a formação da estrutura do biofilme, utilizando os corpos de prova como estrutura base para crescimento. Para a formação do biofilme foi utilizado placas de 24 poços (TPP Techno Plastic Products AG , Zurich, Suiça), onde cada poço foi inicialmente preenchido, com 1 ml do meio caldo BHI. Assim que todos os poços foram preenchidos com meio, foi adicionado 100 µl da solução bacteriana, anteriormente quantificada por espectrofotometria, em cada poço. Após a adição da bactéria, com o auxílio de uma pinça estéril, os corpos de prova foram transferidos, um em cada poço da placa.

As placas foram levemente agitadas e então transferidas para estufa B.O.D com temperatura de 35ºC-37ºC. As placas foram mantidas em estufa durante 7 dias, período adotado para formação do biofilme neste experimento. Neste intervalo de 7 dias de crescimento para a formação do biofilme, a cada 2 dias, se iniciando no 2º dia de formação do biofilme, foi adicionado cerca de 100 µl de meio caldo BHI em cada poço.

3.4 Preparo dos fotossensibilizantes

Para a realização da PDT, foram utilizados dois fotossensibilizantes, em diferentes concentrações. O Photogem®, um derivado hematoporfirinico (TimTec LLC., Newark, Delaware, EUA) que é um tipo de porfirina comercializada para uso em PDT e a curcumina [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona] (PDT Pharma Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos LTDA, Cravinhos, SP, Brasil).

Para o preparo da porfirina, foi preparada uma solução mãe. 5 mg de porfirina foi diluída em 1 ml de água destilada estéril, assim, obteve-se uma

solução de 5 mg/ml. Para a utilização no experimento, foram preparadas diversas diluições desta solução mãe de porfirina para a obtenção de soluções com as concentrações de: 5 µg/ml, 20 µg/ml e 40µg/ml. Todas soluções foram filtradas com auxílio de filtro com membrana (TPP Techno Plastic Products AG , Zurich, Suiça) e transferidas para recipientes estéreis. As soluções foram refrigeradas e armazenadas em recipientes cobertos por papel alumínio, para evitar o contato prévio do fotossensibilizante com a luz.

Para o preparo da curcumina, foi realizada a pesagem do composto. Após a pesagem foi necessário ser feito uma diluição inicial da mesma em Tween 80. Após essa primeira diluição foi adicionada água destilada estéril, em diferentes quantidades, para a obtenção de soluções com as concentrações de: 5 µg/ml, 20 µg/ml e 40 µg/ml. As soluções de curcumina foram preparadas e filtradas minutos antes do seu uso e armazenadas em recipientes estéreis cobertos com papel alumínio.

3.5 Grupos experimentais

Para a realização do experimento, cada grupo experimental foi constituído por 10 corpos de prova (n=10). Os grupos foram divididos de acordo o tipo de fotossensibilizante e luz para ativação do respectivo composto. Neste caso, grupos que utilizaram a porfirina, foram ativados pela luz vermelha (630 nm) com irradiância de 12 mW/cm², e grupos que utilizaram a curcumina, foram ativados pela luz azul (460 nm) com irradiância de 18 mW/cm².

Ambos os fotossensibilizantes foram utilizados em 3 concentrações diferentes: 5 µg/ml, 20 µg/ml e 40 µg/ml. Cada concentração de cada fotossensibilizante foi irradiada pela luz correspondente ao seu espectro de absorção. Os 3 tempos utilizados foram de: 90 segundos, 300 segundos e 600 segundos. Outros grupos foram realizados como controles experimentais. Primeiramente foram testados apenas o efeito das luzes (Azul e Vermelha) nos três tempos preconizados. Também foram realizados grupos que foram testados somente o efeito dos fotossensibilizantes nas três concentrações preconizadas. Por fim, também foram realizados grupos que avaliaram o crescimento de cada cepa sem influência experimental alguma.

3.6 Parâmetros aplicados na terapia fotodinâmica

Para a iluminação dos corpos de prova foi utilizado a Biotable RGB (MMO, São Carlos, SP, Brasil). A biotable RGB é um equipamento emissor de luzes do tipo LED no espectro do vermelho, azul e verde. O equipamento permite a escolha da intensidade das luzes, onde foi utilizada a luz azul na intensidade média (18 mW/cm²) e luz vermelha na intensidade máxima (12 mW/cm²)**.** Este equipamento possui suporte para placas de 24 poços. Os modelos de placa de 24 poços utilizados nesse experimento se encaixam perfeitamente no molde do equipamento.

Para a ativação da porfirina, foi utilizada a luz vermelha (630 nm) nos tempos de 180 segundos, 300 segundos e 600 segundos. Foram realizados grupos controles para cada tempo, onde, os corpos de prova foram irradiados pela luz azul sem estarem sensibilizados pela porfirina. Para a ativação da curcumina, foi utilizada a luz azul (460 nm) nos tempos de 180 segundos, 300 segundos e 600 segundos. Foram realizados grupos controles para cada tempo, onde, os corpos de prova foram irradiados pela luz vermelha sem estarem sensibilizados pela curcumina. Os tempos de iluminação estão relacionados com a dose aplicada a cada corpo de prova, onde a dose irá variar com a potência da luz e o tempo em que ela foi irradiada.

Para os grupos irradiados com a luz azul as doses aplicadas foram: 3,24 J/cm². 5,4 J/cm² e 10,8 J/cm², para os tempos de 180, 300 e 600 segundos respectivamente. Para os grupos irradiados com a luz vermelha, as doses aplicadas foram: 2,16 J/cm², 3,6 J/cm² e 7,2 J/cm², para os tempos de 180, 300 e 600 segundos respectivamente.

3.7 Condições experimentais

Os corpos de prova com o crescimento dos biofilmes foram transferidos, com o auxílio de pinças estéreis, para poços de placa de cultura de células contendo 1 ml de soro fisiológico estéril, apenas para lavagem e remoção do excesso de meio de cultura, onde ficaram durante cerca de 15 segundos. As pinças foram flambadas a cada transferência dos corpo de prova, onde após

esse processo de lavagem, os mesmos corpos de prova foram transferidos pr novas placas. Essas placas continham, em cada poço, 1 ml do fotossensibilizantes correspondente ao grupo experimental a ser realizado. Os corpos de prova ficaram submersos nas soluções de fotossensibilizantes pelo período de 5 minutos. Como observação, toda essa parte experimental foi realizada em ambiente escuro, com o mínimo de luz possível para evitar reação com o fotossensibilizante.

Os grupos que utilizaram apenas a luz ou os grupos que não tiveram influência nem de luz ou fotossensibilizantes, não passaram pela etapa de sensibilização descrita acima. Após a sensibilização, os corpos de prova foram transferidos para novas placas, desta vez, com poços vazios. Essa placa contendo apenas os corpos de prova foi encaixada no suporte da Biotable RGB e então foi realizada a irradiação dos corpos de prova com as luzes. Os corpos de prova dos grupos controle das luzes azul e vermelha, após a lavagem com solução salina, foram diretamente para a irradiação com a Biotable RGB.

A biotable RGB foi configurada de acordo o grupo experimental a ser realizado. Após o início do funcionamento do equipamento, fez-se a contagem do tempo de irradiação de cada grupo, onde 3 tempos foram anteriormente preconizados (180; 300; 600 segundos). Após a contagem da irradiação, o equipamento foi desligado. Os corpos de prova foram transferidos para eppendorfs contendo 1 ml de salina estéril. Cada corpo de prova foi introduzido em um eppendorfs diferente.

Os eppendorfs foram submetidos a agitação continua com o auxílio de aparelho agitador de tubos tipo vortex (Arsec TS200, Vargem Grande Paulista, São Paulo - Brasil) durante cerca de 1 minuto, obtendo-se uma suspensão inicial. Após a agitação e desprendimento de células bacterianas do corpo de prova, foram realizadas diluições decimais que variaram de 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}. Após a realização da diluição, coletou-se 100µl das suspensões bacterianas obtidas pela última diluição, e então foi feita semeadura, em duplicata, em placas de petri contendo meio ágar BHI. As placas semeadas foram incubadas a 35º + 2ºC durante 24 horas. Após o período de incubação, foi obtido o número de colônias que cresceram nas placas com o auxílio de um contador de colônias (PHOENIX CP 608, Araraquara, São Paulo - Brasil). As medidas obtidas foram utilizadas

como parâmetro para saber se os tratamentos com a terapia fotodinamica foram eficientes ou não.

3.8 Avaliação da efetividade da terapia fotodinâmica em isolados clinicos de *A. baumannii*

Após a coleta dos resultados gerados pelos protocolos de PDT, todos os grupos que passaram por esta etapa, para cada fotossensibilizante, foram comparados entre si para eleição do melhor protocolo com atividade antimicrobiana. Após a realização da análise estatística, os grupos 5 µg/ml de porfirina e 40 µg/ml de curcumina foram escolhidos e aplicados nas 3 cepas clinicas (CCBH24267, CCBH24360 e CCBH24383). Para cada cepa clinica utilizada, também foi realizado um grupo controle (n=10) de crescimento bacteriano sem interferência de luz ou corante.

3.9 Análise estatística

Para a verificação da efetividade da terapia fotodinâmica antimicrobiana, os dados referentes a unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foram transformados em log de 10. Primeiramente foi verificado se as amostras dos grupos comparados atendiam aos pressupostos de normalidade e homogeneidade. A verificação da distribuição dos dados foi testada através do uso do teste de Shapiro-wilk. Quando as amostras comparadas atenderam aos pressupostos da distribuição normal, foi aplicado o teste paramétrico ANOVA com 5% de intervalo de confiança (p-valor <0,05). Quando detectada diferença foi utilizado o pós teste de Tukey para a identificação dos grupos que se diferenciaram.

Quando os dados dos grupos analisados não atenderam aos pressupostos de normalidade e homogeneidade, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis, com 5 % de intervalo de confiança (P-valor< 0,05). Quando detectada diferença foi utilizado o pós-teste de Dunn para a identificação dos grupos que se diferenciaram.

Referências

AL-KADMY, I. M. S.; ALI, A. N. M.; SALMAN, I. M. A.; KHAZAAL, S. S. Molecular characterization of Acinetobacter baumannii isolated from Iraqi hospital environment. **New Microbes and New Infections**, v. 21, p. 51–57, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.10.010>.

ALAV, I.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **Journal of Antimicrobiology Chemotherapy**, n. March, 2018.

ALI, A.; BANERJEA, A. C. Curcumin inhibits HIV-1 by promoting Tat protein degradation. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–9, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep27539>.

ALMEIDA, P. P.; PEREIRA, Í. S.; RODRIGUES, K. B.; LEAL, L. S.; MARQUES, A. S.; ROSA, L. P.; DA SILVA, F. C.; DA SILVA, R. A. A. Photodynamic therapy controls of Staphylococcus aureus intradermal infection in mice. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 6, p. 1337–1342, 2017.

ALP, E.; EREN, E.; ELAY, G.; CEVAHIR, F.; ESMAOĞLU, A.; RELLO, J. Efficacy of loading dose of colistin in Acinetobacter baumannii ventilator-associated pneumonia. **Infezioni in Medicina**, v. 25, n. 4, p. 311–319, 2017.

APARECIDA, F.; NEVES, C. Características microbiológicas de cepas de Acinetobacter baumannii resistentes ao imipenem isoladas de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva, e descrição clínico-epidemiológica dos portadores. **Dissertação de Mestrado, UFMG**, 2012.

ARAÚJO, T. S. D.; RODRIGUES, P. L. F.; SANTOS, M. S.; DE OLIVEIRA, J. M.; ROSA, L. P.; BAGNATO, V. S.; BLANCO, K. C.; DA SILVA, F. C. Reduced methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilm formation in bone cavities by photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p.

219–223, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.12.011>.

BEREZIN, E. N.; SOLÓRZANO, F. Gram-negative infections in pediatric and neonatal intensive care units of Latin America. **Journal of infection in developing countries**, v. 8, n. 8, p. 942–53, Jan 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25116658>. Acesso em: 12 sep. 2014.

BETTS, J. W.; SHARILI, A. S.; LA RAGIONE, R. M.; WAREHAM, D. W. In Vitro Antibacterial Activity of Curcumin-Polymyxin B Combinations against Multidrug-Resistant Bacteria Associated with Traumatic Wound Infections. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 6, p. 1702–1706, 2016.

BITRIAN, M.; GONZÁLEZ, R. H.; PARIS, G.; HELLINGWERF, K. J.; NUDEL, C. B. Blue-light-dependent inhibition of twitching motility in Acinetobacter baylyi ADP1: Additive involvement of three BLUF-domain-containing proteins. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 159, n. PART 9, p. 1828–1841, 2013.

BOLUKI, E.; KAZEMIAN, H.; PEERIDOGAHEH, H.; ALIKHANI, M. Y.; SHAHABI, S.; BEYTOLLAHI, L.; GHORBANZADEH, R. Antimicrobial activity of photodynamic therapy in combination with colistin against a pan-drug resistant Acinetobacter baumannii isolated from burn patient. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 1–5, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.01.003>.

BORG, M. A.; TIEMERSMA, E.; SCICLUNA, E.; VAN DE SANDE-BRUINSMA, N.; DE KRAKER, M.; MONEN, J.; GRUNDMANN, H. Prevalence of penicillin and erythromycin resistance among invasive Streptococcus pneumoniae isolates reported by laboratories in the southern and eastern Mediterranean region. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 3, p. 232–237, 2009.

CANNON, J. P.; LEE, T. A.; CLARK, N. M.; SETLAK, P.; GRIM, S. A. The risk of seizures among the carbapenems: A meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 8, p. 2043–2055, 2014.

CEREZALES, M.; OCAMPO-SOSA, A. A.; ÁLVAREZ MONTES, L.; DÍAZ RÍOS, C.; BUSTAMANTE, Z.; SANTOS, J.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; HIGGINS, P. G.; GALLEGO, L. High Prevalence of Extensively Drug-Resistant Acinetobacter baumannii at a Children Hospital in Bolivia. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, p. 1, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29474260%0Ahttp://Insights.ovid.com/cro

ssref?an=00006454-900000000-96728>.
CHINIFORUSH, N.; POURHAJIBAGHER, M.; PARKER, S.; SHAHABI, S.; D, A. B. P. The in vitro effect of antimicrobial photodynamic therapy with indocyanine green on Enterococcus faecalis: influence of a washing vs non-washing procedure. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.09.007>.
CHUI, C.; HIRATSUKA, K.; AOKI, A.; TAKEUCHI, Y.; ABIKO, Y.; IZUMI, Y. Blue LED inhibits the growth of Porphyromonas gingivalis by suppressing the expression of genes associated with DNA replication and cell division. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 44, n. 10, p. 856–864, 2012.
DAI, T.; TEGOS, G. P.; LU, Z.; HUANG, L.; ZHIYENTAYEV, T.; FRANKLIN, M. J.; BAER, D. G.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for Acinetobacter baumannii burn infections in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3929–3934, 2009.
DANIELL, M. D.; HILL, J. S. a History of Photodynamic Therapy. **Australian and New Zealand Journal of Surgery**, v. 61, n. 5, p. 340–348, 1991.
DE AGUIAR COLETTI, T. M. S. F.; DE FREITAS, L. M.; ALMEIDA, A. M. F.; FONTANA, C. R. Optimization of Antimicrobial Photodynamic Therapy in Biofilms by Inhibiting Efflux Pump. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 35, n. 7, p. 378–385, 2017. Disponível em: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/pho.2016.4246>.
DE SOUSA, N. T. A.; SANTOS, M. F.; GOMES, R. C.; BRANDINO, H. E.; MARTINEZ, R.; DE JESUS GUIRRO, R. R. Blue Laser Inhibits Bacterial Growth of *Staphylococcus aureus* , *Escherichia coli,* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 33, n. 5, p. 278–282, 2015. Disponível em: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/pho.2014.3854>.
DEVECI, Ö.; DAL, T.; TEKIN, R.; BOZKURT, F.; TEKIN, A.; DAYAN, S. Resistenza ai carbapenemi in Acinetobacter baumannii: Where is it heading? **Infezioni in Medicina**, v. 21, n. 3, p. 211–215, 2013.
ECE, G.; SAMLIOGLU, P.; ATALAY, S.; KOSE, S. Evaluation of the in vitro colistin susceptibility of Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii strains at a tertiary care centre in Western Turkey Valutazione della sensibilità in vitro a colistina. p. 36–40, 2014.
ESPINAL, P.; MARTÍ, S.; VILA, J. Effect of biofilm formation on the survival of

Acinetobacter baumannii on dry surfaces. **Journal of Hospital Infection**, v. 80, n. 1, p. 56–60, 2012.

FILA, G.; KASIMOVA, K.; ARENAS, Y.; NAKONIECZNA, J. Murine Model Imitating Chronic Wound Infections for Evaluation of Antimicrobial Photodynamic Therapy Efficacy. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. August, p. 1–11, 2016.

GÁNDARA, L.; MAMONE, L.; BOHM, G. C.; BUZZOLA, F.; CASAS, A. Enhancement of photodynamic inactivation of Staphylococcus aureus biofilms by disruptive strategies. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 8, p. 1757–1767, 2017.

GOMEZ, G. F.; HUANG, R.; MACPHERSON, M.; FERREIRA ZANDONA, A. G.; GREGORY, R. L. Photo Inactivation of Streptococcus mutans Biofilm by Violet-Blue light. **Current Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 426–433, 8 Sep 2016. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-016-1075-z>.

HALILOGLU, M.; BILGILI, B.; HALILOGLU, O.; YAVUZ, D. G.; CINEL, I. Original Article Vitamin D level is associated with mortality predictors in ventilator-associated pneumonia caused by Acinetobacter baumannii. **the journal of infection in developing countries**, v. 10, n. 6, 2016.

HSIEH, Y.-H.; ZHANG, J.-H.; CHUANG, W.-C.; YU, K.-H.; HUANG, X.-B.; LEE, Y.-C.; LEE, C.-I. An in Vitro Study on the Effect of Combined Treatment with Photodynamic and Chemical Therapies on Candida albicans. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 337, 2018. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/2/337>.

HUANG, L.; SZEWCZYK, G.; SARNA, T.; HAMBLIN, M. R. Potassium Iodide Potentiates Broad-Spectrum Antimicrobial Photodynamic Inactivation Using Photofrin. **ACS Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 320–328, 2017.

HUANG, Y.; TANAKA, M.; VECCHIO, D.; GARCIA-DIAZ, M.; CHANG, J.; MORIMOTO, Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic Therapy induces an immune response against a bacterial pathogen. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 8, n. 5, p. 479–494, 2012.

HUSE, H. K.; KWON, T.; ZLOSNIK, J. E. a; SPEERT, D. P.; MARCOTTE, E. M.; WHITELEY, M. Pseudomonas aeruginosa enhances production of a non-alginate exopolysaccharide during long-term colonization of the cystic fibrosis lung. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e82621, Jan 2013. Disponível em:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3855792&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 29 sep. 2014.

JORGE, G.; SILVA, D.; DOMINGUES, S. Insights on the Horizontal Gene Transfer of Carbapenemase Determinants in the Opportunistic Pathogen Acinetobacter baumannii. p. 1–23, 2016.

KALKA, K.; MERK, H.; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **Dermatological Phototherapy and Photodiagnostic Methods**, p. 241–280, 2009.

KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 2, p. 310–347, 2009. Disponível em: <http://mmbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00041-08>.

KAWCZYK-KRUPKA, A.; PUCELIK, B.; MIEDZYBRODZKA, A.; SIERON, A.; DABROWSKI, J. M. Photodynamic therapy as an alternative to antibiotic therapy for the treatment of infected leg ulcers. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.041>.

KIM, M. J.; YUK, H. G. Antibacterial mechanism of 405-nanometer light-emitting diode against Salmonella at refrigeration temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 5, p. 1–14, 2017.

KIM, S. W.; KIM, J. S.; LIM, W. B.; JEON, S. M.; KIM, O. S.; KOH, J.-T.; KIM, C.-S.; CHOI, H. R.; KIM, O. J. In Vitro Bactericidal Effects of 625, 525, and 425nm Wavelength (Red, Green, and Blue) Light-Emitting Diode Irradiation. **Photomediine and laser surgery**, v. 31, n. 11, p. 554–562, 2013.

LEE, H. J.; KANG, S. M.; JEONG, S. H.; CHUNG, K. H.; KIM, B. Il. Antibacterial photodynamic therapy with curcumin and Curcuma xanthorrhiza extract against Streptococcus mutans. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 20, p. 116–119, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.09.003>.

LI, Y. H.; TIAN, X. L. Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms: Bacterial Cooperation and Competition. **Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria**, v. 2, p. 1197–1205, 2016.

MACHADO, R. M.; CARVALHO, D. V.; OLIVEIRA, A. C. De. Aspectos

epidemiologicos das infecções hospitalares no centro de terapia intensiva de um hospital universitario. **Revista de enfermagem do centro oeste mineiro**, v. 1, n. 1, p. 9–16, 2011.

MAISCH, T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 14, n. 8, p. 1518–1526, 2015. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5PP00037H>.

MENEGUETI, M. G.; BETONI, N. C.; BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; ROMÃO, E. A. Central venous catheter-related infections in patients receiving short-term hemodialysis therapy: Incidence, associated factors, and microbiological aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 6, p. 783–787, 2017.

METAN, G.; PALA, C.; KAYNAR, L.; CEVAHIR, F.; ALP, E. A nightmare for haematology clinics: extensively drug-resistant (XDR) Acinetobacter baumannnii. **Le infezioni in medicina : rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive**, v. 22, n. 4, p. 277–282, 2014.

MISRA, R.; MORRISON, K. D.; CHO, H. J.; KHUU, T. Importance of real-time assays to distinguish multidrug efflux pump-inhibiting and outer membrane-destabilizing activities in Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, v. 197, n. 15, p. 2479–2488, 2015.

MIYATA, S.; MIYAJI, H.; KAWASAKI, H.; YAMAMOTO, M.; NISHIDA, E.; TAKITA, H.; AKASAKA, T.; USHIJIMA, N.; IWANAGA, T.; SUGAYA, T. Antimicrobial photodynamic activity and cytocompatibility of Au<inf>25</inf>(Capt)<inf>18</inf> clusters photoexcited by blue LED light irradiation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2703–2716, 2017.

MÜLLER, A.; PREUSS, A.; RÖDER, B. Photodynamic inactivation of Escherichia coli – Correlation of singlet oxygen kinetics and phototoxicity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 178, n. August 2017, p. 219–227, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.11.017>.

NEMEZIO, M. A.; DE SOUZA FARIAS, S. S.; BORSATTO, M. C.; AIRES, C. P.; CORONA, S. A. M. Effect of methylene blue-induced photodynamic therapy on a Streptococcus mutans biofilm model. **Photodiagnosis and Photodynamic**

Therapy, v. 20, n. October, p. 234–237, 2017.

NEVES, F. C.; CLEMENTE, W. T.; LINCOPAN, N.; PAIÃO, I. D.; NEVES, P. R.; ROMANELLI, R. M.; LIMA, S. S. S.; PAIVA, L. F.; MOURÃO, P. H. O.; NOBRE-JUNIOR, V. A. Clinical and microbiological characteristics of OXA-23- and OXA-143-producing Acinetobacter baumannii in ICU patients at a teaching hospital, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 556–563, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2016.08.004>.

NICOL, M.; LUIZET, J.; SKOGMAN, M.; JOUENNE, T.; SALCEDO, S. P.; EMMANUELLE, D. Unsaturated Fatty Acids Affect Quorum Sensing Communication System and Inhibit Motility and Biofilm Formation of Acinetobacter baumannii. **international journal of molecula sciences**, p. 1–10, 2018.

OWLIA, P.; AZIMI, L.; GHOLAMI, A.; ASGHARI, B.; LARI, A. R. resistance in Acinetobacter baumannii : a global threat to burn patients. p. 182–187, 2012.

PAIVA, J.-A.; MERGULHÃO, P.; PEREIRA, J. M. Aspergillus and other respiratory fungal infections in the ICU. **Current Opinion in Infectious Diseases**, p. 1, 2018. Disponível em: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00001432-900000000-99286>.

PATRICK R., M.; KEN S., R.; MICHAEL A., P. **Microbiologia Médica**. 6ª Edição ed. [s.l.] Elsevier, 2014.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. Acinetobacter baumannii: Emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 538–582, 2008.

POURHAJIBAGHER, M.; BOLUKI, E.; CHINIFORUSH, N.; POURAKBARI, B.; FARSHADZADEH, Z.; GHORBANZADEH, R.; AZIEMZADEH, M.; BAHADOR, A. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Modulation of virulence in Acinetobacter baumannii cells surviving photodynamic treatment with toluidine blue. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 15, p. 202–212, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.07.007>.

PRAZMO, E. J.; KWASNY, M.; LAPINSKI, M.; MIELCZAREK, A. Photodynamic Therapy As a Promising Method Used. **Adv. Clin. Exp. Med.**, v. 25, n. 4, p. 799–807, 2016.

QIN, H.; LO, N. W.-S.; LOO, J. F.-C.; LIN, X.; YIM, A. K.-Y.; TSUI, S. K.-W.; LAU, T. C.-K.; IP, M.; CHAN, T.-F. Comparative transcriptomics of multidrug-

resistant Acinetobacter baumannii in response to antibiotic treatments. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 3515, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21841-9>.

RAMANATHAN, S.; ARUNACHALAM, K.; CHANDRAN, S.; SELVARAJ, R.; SHUNMUGIAH, K. P.; ARUMUGAM, V. R. Biofilm inhibitory efficiency of phytol in combination with cefotaxime against nosocomial pathogen Acinetobacter baumannii. **Journal of Applied Microbiology**, p. 0–2, 23 Feb 2018. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.13741>.

ROSA, R. A. da; SANTINI, M. F.; FIGUEIREDO, J. A. P. de; VISIOLI, F.; PEREIRA, J. R.; VIVAN, R. R.; MONTAGNER, F.; SÓ, M. V. R. Effectiveness of photodynamic therapy associated with irrigants over two biofilm models. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 20, p. 169–174, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.10.003>.

ROYER, S.; LUIZA, A.; FARIA, S.; MIYUKI, L.; PAVONI, T.; CHAGAS, G.; AMARAL, P.; CAMPOS, D.; WILLIAM, D.; DUTRA, M.; GONTIJO, P. P.; MARQUES, R. Spread of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa clones in patients with ventilator-associated pneumonia in an adult intensive care unit at a university hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 350–357, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2015.03.009>.

SAH, U.; SHARMA, K.; CHAUDHRI, N.; SANKAR, M.; GOPINATH, P. Antimicrobial photodynamic therapy: Single-walled carbon nanotube (SWCNT)-Porphyrin conjugate for visible light mediated inactivation of Staphylococcus aureus. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 162, p. 108–117, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.11.046>.

SAITAWEE, D.; TEERAKAPONG, A.; MORALES, N. P.; JITPRASERTWONG, P.; HORMDEE, D. Photodynamic therapy of Curcuma longa extract stimulated with blue light against Aggregatibacter actinomycetemcomitans. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 2018. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S157210001830019X>.

SANITÁ, P. V.; PAVARINA, A. C.; DOVIGO, L. N.; RIBEIRO, A. P. D.; ANDRADE, M. C.; MIMA, E. G. D. O. Curcumin-mediated anti-microbial photodynamic therapy against Candida dubliniensis biofilms. **Lasers in Medical Science**, p. 1–9, 2017.

SANTEZI, C.; REINA, B. D.; DOVIGO, L. N. Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections-A Review. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 21, n. January, p. 409–415, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29378256>.

SATO, Y.; UNNO, Y.; UBAGAI, T.; ONO, Y. Sub-minimum inhibitory concentrations of colistin and polymyxin B promote Acinetobacter baumannii biofilm formation. p. 1–18, 2018.

SHACKLEY, D. C.; WHITEHURST, C.; CLARKE, N. W.; BETTS, C.; MOORE, J. V. Photodynamic therapy. **Deri Hastaliklari ve Frengi Arsivi**, v. 33, n. 3, p. 137–148, 1999. Disponível em: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L30225812%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=1019214X&id=doi:&atitle=Photodynamic+therapy&stitle=Deri.+Hast.+Frengi+Ars.&title=Deri+Hastaliklari+ve+Frengi+Arsivi&volum>.

SKRZAT-KLAPACZYŃSKA, A.; MATŁOSZ, B.; BEDNARSKA, A.; PACIOREK, M.; FIRLĄG-BURKACKA, E.; HORBAN, A.; KOWALSKA, J. D. Factors associated with urinary tract infections among HIV-1 infected patients. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2018.

SÖKMEN, M.; AKRAM KHAN, M. The antioxidant activity of some curcuminoids and chalcones. **Inflammopharmacology**, v. 24, n. 2–3, p. 81–86, 2016.

SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**, v. 5594, n. December, p. 223–229, 2015.

SOUZA, E. S.; BELEI, R. A.; CARRILHO, C. M. D. de M.; MATSUO, T.; YAMADA-OGATTA, S. F.; ANDRADE, G.; PERUGINI, M. R. E.; PIERI, F. M.; DESSUNTI, E. M.; KERBAUY, G. Mortalidade e riscos associados a infecção relacionada à assistência à saúde. **Texto e Contexto Enfermagem**, v. 24, n. 1, p. 220–228, 2015.

SPERANDIO, F. F.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Kill Gram-negative Bacteria. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, v. 8, n. 2, p. 1–23, 2013.

SUBASHCHANDRABOSE, S.; SMITH, S.; DEORNELLAS, V.; CREPIN, S.; KOLE, M.; ZAHDEH, C.; MOBLEY, H. L. T. Acinetobacter baumannii Genes

Required for Bacterial Survival during Bloodstream Infection. **mSphere**, v. 1, n. 1, p. e00013-15, 2016. Disponível em: <http://msphere.asm.org/content/1/1/e00013-15.abstract>.

TEGOS, G. P.; MASAGO, K.; AZIZ, F.; HIGGINBOTHAM, A.; STERMITZ, F. R.; HAMBLIN, M. R. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3202–3209, 2008.

TOWNER, K. J. Acinetobacter: an old friend, but a new enemy. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, n. 4, p. 355–363, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2009.03.032>.

TOWNSEND, C. M.; BEAUCHAMP, R. D.; EVERS, B. M.; MATTOX, K. l. Tratado de Cirurgia - A Base Biológica da Prática Cirurgica Moderna. **Tradução Alexandre Maceri Midão Et Al.**, p. 2046, 2015.

TSAI, W. H.; YU, K. H.; HUANG, Y. C.; LEE, C. I. EGFR-targeted photodynamic therapy by curcumin-encapsulated chitosan/TPP nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 903–916, 2018.

TURLIN, E.; HEUCK, G.; SIM??ES BRAND??O, M. I.; SZILI, N.; MELLIN, J. R.; LANGE, N.; WANDERSMAN, C. Protoporphyrin (PPIX) efflux by the MacAB-TolC pump in Escherichia coli. **MicrobiologyOpen**, v. 3, n. 6, p. 849–859, 2014.

VIJAY, G.; MANDAL, A.; SANKAR, J.; KAPIL, A.; LODHA, R.; KABRA, S. K. Ventilator Associated Pneumonia in Pediatric Intensive Care Unit: Incidence, Risk Factors and Etiological Agents. **Indian Journal of Pediatrics**, p. 5–10, 2018.

VIJAYAKUMAR, S.; RAJENDERAN, S.; LAISHRAM, S.; ANANDAN, S.; BALAJI, V.; BISWAS, I. Biofilm Formation and Motility Depend on the Nature of the Acinetobacter baumannii Clinical Isolates. **Frontiers in Public Health**, v. 4, n. May, p. 105, 2016. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpubh.2016.00105>.

WAINWRIGHT, M.; SMALLEY, H.; SCULLY, O.; LOTFIPOUR, E. Comparative Photodynamic Evaluation of New Phenothiazinium Derivatives against Propionibacterium acnes †. n. 10, p. 523–526, 2012.

WINKLER, K.; SIMON, C.; FINKE, M.; BLESES, K.; BIRKE, M.; SZENTMÁRY, N.; HÜTTENBERGER, D.; EPPIG, T.; STACHON, T.; LANGENBUCHER, A.;

FOTH, H.; HERRMANN, M.; SEITZ, B.; BISCHOFF, M. Photodynamic inactivation of multidrug-resistant Staphylococcus aureus by chlorin e6 and red light (λ = 670 nm). **Journal of Photochemistry & Photobiology**, v. 162, p. 340–347, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.07.007>.

YANG, M.-Y.; CHANG, K.-C.; CHEN, L.-Y.; WANG, P.-C.; CHOU, C.-C.; WU, Z.-B.; HU, A. Blue light irradiation triggers the antimicrobial potential of ZnO nanoparticles on drug-resistant Acinetobacter baumannii. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, n. 2017, 2018. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134417313222>.

YEO, H. J.; YOON, S. H.; LEE, S. E.; CHO, W. H.; KIM, D.; JEON, D.; SHIN, K.-H.; KIM, Y. S. Bacterial Biofilms on Extracorporeal Membrane Oxygenation Catheters. **American society of artificial internal organs**, 2018.

YUAN, Y.; LIU, Z.-Q.; JIN, H.; SUN, S.; LIU, T.-J.; WANG, X.; FAN, H.-J.; HOU, S.-K.; DING, H. Photodynamic antimicrobial chemotherapy with the novel amino acid-porphyrin conjugate 4I: In vitro and in vivo studies. **PloS one**, v. 12, n. 5, p. e0176529, 2017.

ZINNE, N.; KRUEGER, M.; HOELTIG, D.; TUEMMLER, B.; BOYLE, E. C.; BIANCOSINO, C.; HOEFFLER, K.; BRAUBACH, P.; RAJAB, T. K.; CIUBOTARU, A.; ROHDE, J.; WALDMANN, K.-H.; HAVERICH, A. Treatment of infected lungs by ex vivo perfusion with high dose antibiotics and autotransplantation: A pilot study in pigs. **Plos One**, v. 13, n. 3, p. e0193168, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29505574%0Ahttp://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0193168>.

4. CAPITULO 1

Avaliação *in vitro* da atividade bactericida de diferentes protocolos de Terapia Fotodinâmica mediada por porfirina frente a biofilmes de *Acinetobacter baumannii*

Padrõnizada para a revista: Laser in surgery and medicine

Abstract:

Objetivos: Avaliar a efetividade bactericida *in vitro* de diferentes protocolos de terapia fotodinâmica (PDT) utilizando o fotossensibilizante (FS) porfirina frente a biofilmes de cepas padrão e clinicas de *Acinetobacter baumannii.*

Materiais e métodos: Foram utilizados 160 corpos-de-prova (CP) de resina acrílica para a formação dos biofilmes que foram introduzidos individualmente em poços de placas de cultura de células de 24 poços acrescidos de 1 mL do meio de cultura caldo BHI e 100 µL de suspensão de *A. baumannii* padronizada em espectrofotômetro. As placas foram incubadas por 7 dias a 36º C. Após esse período os CPs foram divididos em grupos (n = 10) de acordo com a concentração do FS (5 µg/mL; 20 µg/mL; 40 µg/mL) e tempo de irradiação com a luz (3, 5 e 10 minutos). Foi utilizado LED de 630 nm com intensidade de 12 mW/cm^2 e fluências de 2,16 J/cm^2; 3,6 J/cm^2 e 7,2 J/cm^2 de acordo com os tempos já descritos. Grupos controle em que nenhum tratamento foi realizado, grupos tratados somente com o FS nas diferentes concentrações e grupos tratados somente com luz LED nos diferentes tempos foram realizados. Após os tratamentos foram obtidas diluições decimais por meio de agitação dos CPs que foram semeadas em duplicata em placas de Petri contendo meio ágar BHI e incubadas durante 24 horas a 36º C sendo realizada a contagem de UFC/mL. A comparação entre os grupos foi realizada pelo este estatístico Kruskall-Wallis com pós-teste de Dunn (95%)

Resultados: Os grupos PDT com o FS na concentração de 5 µg/mL reduziram de maneira significativa ($p < 0,05$) o log10 UFC/mL da cepa padrão de A. baumannii quando comparados aos grupos tratados com o FS na concentração de 40 µg/mL. O protocolo de PDT com o FS na concentração de 5

µg/mL e irradiação com a dose de 2,26 J/cm² foi utilizado para os testes frente a três cepas clínicas de *A. baumannii* mostrando redução estatística significativa ($p < 0,05$) no log10 UFC/mL quando comparadas aos seus grupos controle.

Conclusão: Os protocolos de PDT, utilizando a porfirina como fotossensibilizante, testados neste trabalho, mostraram efetividade bactericida frente a biofilmes de cepas padrão e clínicas de *A. baumannii* sendo o protocolo com o FS na concentração de 5 µg/mL e irradiação com dose de 2,16 J/cm² foi o mais efetivo.

Palavras chaves: Infecção hospitalar; Biofilm ;*Acinetobacter baumannii* ;Terapia fotodinâmica; Porfirina;

Introdução

As infecções hospitalares são um dos grandes problemas de saúde da atualidade, sendo uma das principais responsáveis causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (MACHADO; CARVALHO; OLIVEIRA, 2011). Essas infecções geralmente estão associadas a fatores de risco como terapias invasivas e/ou indivíduos com algum imunocomprometimento, situados em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI's) e Centros de Tratamento Intensivo (CTI's) (HALILOGLU et al., 2016; MENEGUETI et al., 2017).

Acinetobacter baumannii é uma bactéria pleomorfica, cocobacilo gram-negativa, aeróbia obrigatório e hoje é um dos patógenos que mais causam infecções no âmbito hospitalar (METAN et al., 2014). Um dos principais problemas quanto a infecções causadas por este patógeno é a susceptibilidade reduzida a antibioticoterapia. Muitos estudos apontam a existência de cepas de *A. baumannii* multi-resistente a antibióticos (MDR) e até mesmo extensivamente-resistente a antibióticos (XDR) (CEREZALES et al., 2018; YANG et al., 2018).

Um fator de virulência que é expresso por diversas bactérias, que juntamente a resistência a antibióticos, dificulta o controle das infecções como também a desinfecção do ambiente hospitalar, é a produção de biofilmes (SATO et al., 2018). O biofilme tem a função de aderir as bactérias umas às outras e também fixar as mesmas em superfícies de materiais como cateteres e

equipamentos de ventilação mecânica. Estudos também apontam que o biofilme funciona como mecanismo de proteção a antibióticos (SOTO, 2015; ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018).

Tendo em vista essa atual dificuldade no controle das infecções hospitalares, é extremamente interessante o desenvolvimento de estratégias e ferramentas que visem, ao menos, auxiliar a antibioticoterapia ou sanitização do ambiente hospitalar. Os experimentos de Oscar Raab, em 1900, evidenciaram um efeito microbicida promovido pela luz em estudos com *Paramecium spp.* Esse evento deu início aos estudos da técnica de Terapia fotodinâmica (PDT) (KALKA; MERK; MUKHTAR, 2009).

A PDT faz uso de irradiação luminosa, podendo as fontes luminosas serem produzidas por lasers ou LEDs, associada a corantes fotossensibilizantes, o que promove a morte não tóxica de microrganismos na presença de oxigênio (PRAZMO et al., 2016). Um dos fotossensibilizantes (FS) utilizados na atualidade é a porfirina (Photogem®) sendo utilizada em diversas pesquisas no combate ao câncer e a microrganismos. Entretanto, trabalhos com finalidade antimicrobiana utilizando PDT mediada por porfirina no combate de *A. baumannii,* são escassos não existindo terapias bem estabelecidas.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi estabelecer protocolos de terapia fotodinâmica antimicrobiana para biofilmes de *A. baumannii* (ATCC 19606) utilizando o FS Photogem® nas concentrações de 5 µg/ml, 20 µg/ml e 40 µg/ml e avaliar o comportamento do melhor protocolo encontrado frente a biofilmes de 3 cepas clinicas de *A. baumannii* (CCBH24267, CCBH24360 e CCBH24383).

MATERIAL E METODOS

Confecção dos corpos-de-prova

Para o desenvolvimento do presente estudo foram utilizados como corpos-de-prova 160 discos de resina acrílica ativada quimicamente (RAAQ) (TDV Dental Ltda. Pomerode, SC, Brasil) medindo 6,4 mm de diâmetro e 3 mm

de altura. Os corpos-de-prova foram esterilizados em autoclave a 121º C durante 15 minutos.

Cultivo do microrganismo e formação do biofilme

Foram utilizadas cepas padrão de *Acinetobacter Baumannii* INCQS 00143 (ATCC 19606) provenientes da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária-CMRVS (FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e cepas clínicas da mesma espécie, pertencente a Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar (CCBH) (FIOCRUZ-CCBH, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) das linhagens CCBH24267, CCBH24360 e CCBH24383.

A ativação do microrganismo foi feita em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Himedia Laboratories, Mumbai, India) por 24 horas a 35º ± 2º C em estufa B.O.D. Após a ativação, 100 µl do crescimento foi semeado em placas de Petri contendo ágar BHI (Himedia Laboratories, Mumbai, India) e incubadas por 24 horas a 35º ± 2º C em estufa B.O.D. Após 24 horas, foi obtida uma suspensão padronizada em $1X10^6$ células/mL em espectrofotometria.

No interior do fluxo laminar, foram preparadas placas de cultura de células de 24 poços estéreis, onde cada poço foi preenchido com 3 ml de meio de cultura caldo BHI (Himedia Laboratories, Mumbai, India) onde foi adicionado o microrganismo e um corpo-de-prova por poço.. As placas foram incubadas a 35º ± 2º C por 7 dias para a formação dos biofilmes, e durante o período de incubação as condições de cultivo (umidade e nutrição) foram verificadas diariamente.

Fotossensibilizante e fonte de luz

Foi utilizado o FS porfirina Photogem ® (TimTec LLC., Newark, Delaware, EUA) preparado pela diluição do pó em água destilada estéril para a obtenção das concentrações de 5 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL. Para a iluminação dos corpos de prova foi utilizado o equipamento Biotable® RGB (MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) que consiste em uma mesa iluminadora de LEDs com os comprimentos de onda de 460, 530 e 630 nm. Os LEDs são arranjados de maneira que cada poço seja iluminado por um LED permitindo produzir

iluminação uniforme em toda placa. No estudo em questão foi utilizado o LED vermelho (630 nm), nos tempos de 180 segundos, 300 segundos, 600 segundos, com fluências de 2,16 J/cm², 3,6 J/cm² e 7,2 J/cm².

Procedimentos experimentais

Os corpos-de-prova com o crescimento dos biofilmes foram lavados por 15 segundos em 1 mL de soro fisiológico estéril para remoção do excesso de meio de cultura. Após esse período foram transferidos para poços de placa de cultura de células contendo 1ml do FS utilizado por 5 minutos (período pré-irradiação) em uma das concentrações descritas (5, 20 ou 40 µg/mL), em ambiente escuro. Após o período os corpos-de-prova foram transferidos para novos poços e realizada a irradiação com LED nos tempos estipulados (90, 300 ou 600 segundos). Após a irradiação, os corpos de prova foram introduzidos individualmente em eppendorfs estéreis de 1,5 ml contendo soro fisiológico estéril e agitados em aparelho agitador de tubos tipo vortex durante 1 minuto.

Após agitação, as soluções foram diluídas e em sequência semeadas em duplicata, em placas de Petri contendo meio de cultura agar BHI (Himedia Laboratories, Mumbai, India) e incubadas a 35º ± 2ºC durante 24 horas. Após o período de incubação foi realizada contagem de UFC/ml. Foram inclusos grupos controle em que nenhum tratamento foi realizado, grupos em que somente o FS nas diferentes concentrações foram testados e grupos em que somente as luzes nos diferentes tempos de iluminação foram avaliados. Os grupos foram formados por 10 corpos-de-prova para cada teste realizado. O melhor protocolo obtido foi testado para as cepas clínicas mencionadas anteriormente.

Análise estatística

Os dados referentes a unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foram transformados em log10. Os pressupostos de normalidade e homogeneidade foram verificados através do teste estatístico de Shapiro-Wilk. Foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskall-Wallis, utilizando intervalo de confiança de 95% (p-valor<0,05) com pós-teste de Dunn para comparação entre os grupos experimenteis de cepas ATCC. Para as comparações da efetividade do melhor protocolo de PDT em cepas clínicas foi utilizado o teste Mann-Whitney utilizando intervalo de confiança de 95% (p-valor<0,05).

Resultados

Após a realização dos diversos protocolos de terapia fotodinâmicas, os resultados foram coletados e então analisados. Todos protocolos de PDT, utilizando a porfirina como FS, obtiveram ótimos resultados na redução da carga bacteriana de *A. baumannii.* Foram testadas três concentrações diferentes do FS, sendo 5 µg/mL , 20 µg/mL e 40 µg/mL . A figura 1 mostra os resultados dos tratamentos realizados com o FS na concentração de 5 µg/mL quando irradiados com LED vermelha, recebendo doses de 2,16 J/cm², 3,6 J/cm² e 7,2 J/cm². Todos os protocolos testados foram muito eficientes na redução do log10 UFC/mL quando comparados com o grupo controle ($p<0,001$).

O mesmo padrão de eficiência na redução do log10 UFC/mL de *A. baumannii* foi encontrado nos protocolos de PDT utilizando o FS na concentração de 20 µg/mL e 40 µg/mL. A figura 2 mostra os resultados com o FS na concentração de 20 µg/mL, onde todos os protocolos de PDT testados com as doses de 2,16 J/cm², 3,6 J/cm² e 7,2 J/cm², quando comparados ao grupo controle, detectou significante diferença estatística na redução da carga bacteriana do biofilme ($p<0,001$).

Quando utilizado o FS com a concentração de 40 µg/mL para a aplicação da PDT, a carga bacteriana foi reduzida significativamente quando utilizadas as doses de luz vermelha de 2,16 J/cm², 3,6 J/cm² e 7,2 J/cm², se diferenciando estatisticamente do grupo controle de crescimento bacteriano ($p<0,001$), como pode ser observado na figura 3.

Quando feitas as comparações entre todos os protocolos testados, a figura 4 mostra que os grupos tratados com 5 µg/mL e dose de 2,16 J/cm² reduziu de maneira mais eficiente o log10 UFC/mL de *A. baumannii* quando comparado maioria dos outros protocolos testados (**=$p<0,01$; ***=$p<0,001$)

Como o protocolo de PDT utilizando o FS na concentração de 5 µg/mL sendo ativado pela dose de 2,16 J/cm², se apresentou como um dos melhores tratamentos realizados nesse trabalho, o mesmo foi aplicado em três cepas clinicas de *A. baumannii*. Com a aplicação deste protocolo foi verificado que, assim como ocorreu com a cepa padrão, este tratamento reduziu de maneira

muito significativa a carga bacteriana das três cepas clinicas testadas (p<0,001), como exibido na Figura 5.

Discussão

Infecções causadas em ambientes hospitalares por *A. baumannii* têm acontecido cada vez mais, gerando variáveis quadros de infecções na pele, em queimaduras, trato urinário, trato respiratório, meningite, infecções em tecidos moles e no sangue (ESPINAL; MARTÍ; VILA, 2012; PATRICK R.; KEN S.; MICHAEL A., 2014; SUBASHCHANDRABOSE et al., 2016; VIJAYAKUMAR et al., 2016; RAMANATHAN et al., 2018). A extensa presença desse patógeno no ambiente hospitalar ocorre devido a expressão de fatores de virulências como o biofilme, que aumenta a persistência desse microrganismo no ambiente (YEO et al., 2018).

A. baumannii é uma das principais bactérias causadoras de infecções no ambiente hospitalar, e o desenvolvimento de novas estratégias de combate é de suma importância para o controle desse patógeno. A PDT é uma importante ferramenta para o controle de microrganismos patogênicos em um futuro com baixa disponibilidade de antibióticos (MAISCH, 2015; KAWCZYK-KRUPKA et al., 2018).

A aplicação da PDT como terapia de feridas contaminadas por *A. baumannii* ou a sanitização de equipamentos com alta tendência de formação de biofilmes por este microrganismo, poderia reduzir significativamente os relatos de infecções no ambiente hospitalar. A formação de biofilme de *A.* baumannii em equipamentos como cateteres está associado a infecções com altas taxas de mortalidade (YEO et al., 2018).

No presente estudo, foram avaliados diversos protocolos de PDT para controle de *A. baumannii,* já que a técnica têm sido eficiente no controle de outras espécies de microrganismos (GÁNDARA et al., 2017; NEMEZIO et al., 2017; ROSA et al., 2017). A porfirina é um FS que demonstra atividade microbicida contra diversos microrganismos, dentre eles as bactérias (SAH et al., 2018). A avaliação do efeito de fontes de luz também é realizada em diversos estudos quanto a sua ação em microrganismos

Quando analisado em nosso trabalho, apenas o efeito da luz vermelha, a dose de luz vermelha a 2,16 J/cm², mostrou redução significativa da carga bacteriana de *A. baumannii.* Entretanto, apesar de ter reduzido a carga bacteriana de *A. baumannii*, a luz vermelha quando aplicada em outras espécies de bactérias, como por exemplo, *P. gingivalis*, *E. coli* e *S. aureus,* quando, não alcança algum efeito na inativação das mesmas (KIM et al., 2013). Assim como foi realizado grupos controles com o uso apenas da luz vermelha, foram realizados grupos controles utilizando apenas o FS.

É sabido que a estrutura de bactérias gram-negativas possui características celulares peculiares, possuindo duas membranas lipídicas, uma camada de peptideoglicano entre elas e o lipopolissacarideo sob a camada externa, o que torna estes tipos celulares menos porosos (SPERANDIO; HUANG; HAMBLIN, 2013). Esta estrutura compartilhada entre as bactérias gram-negativas faz com que elas sejam menos susceptíveis a absorverem os fotossensibilizantes, o que dificulta a ação da PDT (KAWCZYK-KRUPKA et al., 2018; MÜLLER; PREUSS; RÖDER, 2018).

Ao analisar apenas o efeito do FS sobre as bactérias da espécie *A. baumannii,* foi possível observar que, mesmo com a estrutura apresentado pela bactéria, as concentrações testadas do fotossensibilizantes conseguiram reduzir o log10 UFC/mL do microrganismo testado, assim, demonstrando que a porfirina possui capacidade antibacteriana.

A PDT tem surgido como uma ferramenta que pode auxiliar o tratamento de bactérias multi-resistentes a antibióticos por não gerar mecanismos de resistência (YUAN et al., 2017) tornando a PDT muito atrativa. Os protocolos com as concentrações de 5 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL do FS, ativados com as fluências de 2,16 J/cm², 3,6 J/cm² e 7,2 J/cm², conseguiram reduzir significativamente o log10 UFC/mL de *A. baumannii* no modelo de biofilme.

O uso do fotossensibilizante TBO (50 µg/mL), em modelo de crescimento de *A. baumannii* em caldo BHI, sendo ativado por LED vermelha, reduziu em 31,7 vezes carga bacteriana após PDT, usando uma fluência de 180 J/cm² (BOLUKI et al., 2017). O uso do photofrin (600 µg/mL), sendo ativado por LED azul (415 nm), reduz a carga bacteriana de *A. baumannii* usando fluência de 10

J/cm², em um modelo de crescimento em caldo BHI (HUANG et al., 2017). Yuan e colaboradores utilizaram o PS 41 em um modelo de PDT in vivo de ferida em camundongos BALB/c. Este tratamento durante 30 minutos com dose de 6 J/cm², reduziu drasticamente a carga bacteriana e aumentou de forma muito significativa a sobrevivência dos animais infectados.

O uso da PDT vem sendo aperfeiçoado, somando a sua aplicação ao uso de antibióticos. Cepas de *A. baumannii* resistentes a colistina, foram tratadas com PDT, usando o TBO (0,4 mg/mL) e LED vermelho (635 nm), e adicionalmente, outro grupo foi tratado com a PDT e colistina. O grupo PDT reduziu em 80% a carga bacteriana, e interessantemente, quando analisado o grupo PDT e colistina, todas as bactérias foram eliminadas (POURHAJIBAGHER et al., 2016). Nossos resultados mostram que todos os grupos que foram tratados com os diversos protocolos de PDT diminuíram a carga bacteriana de *A. baumannii*, sendo dados que corroboram com os apresentados pelos trabalhos que usaram a PDT em *A. baumannii*.

Quando comparados todos os protocolos de PDT entre si, é possível observar diferenças principalmente entre os grupos tratados com 5 µg/Ml e 40 µg/Ml, mostrando que a PDT usando a concentração de 5 µg/Ml foi mais eficiente.

Ao ser absorvida pela célula bacteriana, o FS será ativado pela luz, o que irá gerar uma serie de reações químicas com a consequente produção de espécies reativas de oxigênio (SPERANDIO; HUANG; HAMBLIN, 2013). Existem dois tipos de reações geradas pela PDT, a reação de tipo I e tipo II, assim, produzindo moléculas tóxicas para as bactérias (PRAZMO et al., 2016; HUANG et al., 2017).

O Mecanismo de bomba de efluxo é uma ferramenta desenvolvida por bactérias para escapar da atividade de antibióticos, os expulsando para fora da célula (MISRA et al., 2015; KIM; YUK, 2017). Mecanismo de bomba de efluxo de fotossensibilizantes tem sido detectado em algumas bactérias, ou seja, assim como o antibiótico, o fotossensibilizante entra na célula bacteriana, mas ela o devolve ao meio, sendo que, outros estudos indicam que inibidores de bombas de afluxo bacteriana, potencializam a PDT antimicrobiana (TEGOS et al., 2008; TURLIN et al., 2014) . Talvez um mecanismo semelhante, que possa ter sido

ativado em *A. baumannii,* devido ao aumento das concentrações do fotossensibilizante. Assim, a menor concentração do fotossensibilizante dentro das células gera menor a proporção de radicais livres, o que justificaria nossos resultados

Deste modo, foi escolhido um dos melhores protocolos gerados pelo nosso trabalho, que foi a terapia fotodinâmica utilizando porfirina (5 µg/Ml) durante 3 minutos, com a dose respectiva de 2,16 J/cm², e aplicamos em três cepas clinicas de *A. baumannii* formadoras de biofilme (CCBH24267, CCBH24360 e CCBH24383). Como exibidos em nossos resultados, o protocolo escolhido foi tão eficiente em sua ação antibacteriana nas cepas CCBH24267, CCBH24360 e CCBH24383, o que pode ser visto ao comparar o grupo experimental com o grupo controle referente a mesma cepa.

Mesmo obtendo bons resultados, mais estudos são necessários para aprofundar o conhecimento e identificar a reação da bactéria quanto ao nivel de concentração do fotossensibilizante e os índices de espécies reativas de oxigênio produzidas pela reação, o que poderia explicar porque a menor concentração testada apresentou os melhores resultados.

Conclusões

- Os protocolos de terapia fotodinâmica desenvolvidos neste trabalho se apresentaram eficientes na redução da carga bacteriana de *A. baumannii* utilizando o modelo de biofilme.
- Apesar de todos os protocolos testados conseguirem ter boa efetividade na redução do log10 UFC/mL do biofilme formado por *A. baumannii,* a concentração de 5 µg/mL do FS com a dose de 2,16 J/cm², se mostrou um dos melhores protocolos testados
- O protocolo de 5 µg/mL com a dose de 2,16 J/cm² foi testado e se mostrou muito eficiente na redução da carga bacteriana de cepas de *A. baumannii* isoladas em ambientes clínicos.
- Todos os resultados obtidos neste trabalho demonstram o sucesso da PDT utilizando o Photogem ® como fotossensibilizante em pequenas concentrações e com pequenas doses.

Referências

AL-KADMY, I. M. S.; ALI, A. N. M.; SALMAN, I. M. A.; KHAZAAL, S. S. Molecular characterization of Acinetobacter baumannii isolated from Iraqi hospital environment. **New Microbes and New Infections**, v. 21, p. 51–57, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.10.010>.

ALAV, I.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **Journal of Antimicrobiology Chemotherapy**, n. March, 2018.

ALI, A.; BANERJEA, A. C. Curcumin inhibits HIV-1 by promoting Tat protein degradation. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–9, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep27539>.

ALMEIDA, P. P.; PEREIRA, Í. S.; RODRIGUES, K. B.; LEAL, L. S.; MARQUES, A. S.; ROSA, L. P.; DA SILVA, F. C.; DA SILVA, R. A. A. Photodynamic therapy controls of Staphylococcus aureus intradermal infection in mice. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 6, p. 1337–1342, 2017.

ALP, E.; EREN, E.; ELAY, G.; CEVAHIR, F.; ESMAOĞLU, A.; RELLO, J. Efficacy of loading dose of colistin in Acinetobacter baumannii ventilator-associated pneumonia. **Infezioni in Medicina**, v. 25, n. 4, p. 311–319, 2017.

APARECIDA, F.; NEVES, C. Características microbiológicas de cepas de Acinetobacter baumannii resistentes ao imipenem isoladas de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva, e descrição clínico-epidemiológica dos portadores. **Dissertação de Mestrado, UFMG**, 2012.

ARAÚJO, T. S. D.; RODRIGUES, P. L. F.; SANTOS, M. S.; DE OLIVEIRA, J. M.; ROSA, L. P.; BAGNATO, V. S.; BLANCO, K. C.; DA SILVA, F. C. Reduced methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilm formation in bone cavities by photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 219–223, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.12.011>.

BEREZIN, E. N.; SOLÓRZANO, F. Gram-negative infections in pediatric and neonatal intensive care units of Latin America. **Journal of infection in developing countries**, v. 8, n. 8, p. 942–53, Jan 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25116658>. Acesso em: 12 sep. 2014.

BETTS, J. W.; SHARILI, A. S.; LA RAGIONE, R. M.; WAREHAM, D. W. In Vitro Antibacterial Activity of Curcumin-Polymyxin B Combinations against Multidrug-Resistant Bacteria Associated with Traumatic Wound Infections. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 6, p. 1702–1706, 2016.

BITRIAN, M.; GONZÁLEZ, R. H.; PARIS, G.; HELLINGWERF, K. J.; NUDEL, C. B. Blue-light-dependent inhibition of twitching motility in Acinetobacter baylyi ADP1: Additive involvement of three BLUF-domain-containing proteins. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 159, n. PART 9,

p. 1828–1841, 2013.
BOLUKI, E.; KAZEMIAN, H.; PEERIDOGAHEH, H.; ALIKHANI, M. Y.; SHAHABI, S.; BEYTOLLAHI, L.; GHORBANZADEH, R. Antimicrobial activity of photodynamic therapy in combination with colistin against a pan-drug resistant Acinetobacter baumannii isolated from burn patient. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 1–5, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.01.003>.
BORG, M. A.; TIEMERSMA, E.; SCICLUNA, E.; VAN DE SANDE-BRUINSMA, N.; DE KRAKER, M.; MONEN, J.; GRUNDMANN, H. Prevalence of penicillin and erythromycin resistance among invasive Streptococcus pneumoniae isolates reported by laboratories in the southern and eastern Mediterranean region. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 3, p. 232–237, 2009.
CANNON, J. P.; LEE, T. A.; CLARK, N. M.; SETLAK, P.; GRIM, S. A. The risk of seizures among the carbapenems: A meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 8, p. 2043–2055, 2014.
CEREZALES, M.; OCAMPO-SOSA, A. A.; ÁLVAREZ MONTES, L.; DÍAZ RÍOS, C.; BUSTAMANTE, Z.; SANTOS, J.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; HIGGINS, P. G.; GALLEGO, L. High Prevalence of Extensively Drug-Resistant Acinetobacter baumannii at a Children Hospital in Bolivia. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, p. 1, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29474260%0Ahttp://Insights.ovid.com/crossref?an=00006454-900000000-96728>.
CHINIFORUSH, N.; POURHAJIBAGHER, M.; PARKER, S.; SHAHABI, S.; D, A. B. P. The in vitro effect of antimicrobial photodynamic therapy with indocyanine green on Enterococcus faecalis: influence of a washing vs non-washing procedure. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.09.007>.
CHUI, C.; HIRATSUKA, K.; AOKI, A.; TAKEUCHI, Y.; ABIKO, Y.; IZUMI, Y. Blue LED inhibits the growth of Porphyromonas gingivalis by suppressing the expression of genes associated with DNA replication and cell division. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 44, n. 10, p. 856–864, 2012.
DAI, T.; TEGOS, G. P.; LU, Z.; HUANG, L.; ZHIYENTAYEV, T.; FRANKLIN, M. J.; BAER, D. G.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for Acinetobacter baumannii burn infections in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3929–3934, 2009.
DANIELL, M. D.; HILL, J. S. a History of Photodynamic Therapy. **Australian and New Zealand Journal of Surgery**, v. 61, n. 5, p. 340–348, 1991.
DE AGUIAR COLETTI, T. M. S. F.; DE FREITAS, L. M.; ALMEIDA, A. M. F.; FONTANA, C. R. Optimization of Antimicrobial Photodynamic Therapy in Biofilms by Inhibiting Efflux Pump. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 35, n. 7, p. 378–385, 2017. Disponível em: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/pho.2016.4246>.
DE SOUSA, N. T. A.; SANTOS, M. F.; GOMES, R. C.; BRANDINO, H. E.; MARTINEZ, R.; DE JESUS GUIRRO, R. R. Blue Laser Inhibits Bacterial Growth of *Staphylococcus aureus* ,

Escherichia coli, and *Pseudomonas aeruginosa*. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 33, n. 5, p. 278–282, 2015. Disponível em: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/pho.2014.3854>.

DEVECI, Ö.; DAL, T.; TEKIN, R.; BOZKURT, F.; TEKIN, A.; DAYAN, S. Resistenza ai carbapenemi in Acinetobacter baumannii: Where is it heading? **Infezioni in Medicina**, v. 21, n. 3, p. 211–215, 2013.

ECE, G.; SAMLIOGLU, P.; ATALAY, S.; KOSE, S. Evaluation of the in vitro colistin susceptibility of Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii strains at a tertiary care centre in Western Turkey Valutazione della sensibilità in vitro a colistina. p. 36–40, 2014.

ESPINAL, P.; MARTÍ, S.; VILA, J. Effect of biofilm formation on the survival of Acinetobacter baumannii on dry surfaces. **Journal of Hospital Infection**, v. 80, n. 1, p. 56–60, 2012.

FILA, G.; KASIMOVA, K.; ARENAS, Y.; NAKONIECZNA, J. Murine Model Imitating Chronic Wound Infections for Evaluation of Antimicrobial Photodynamic Therapy Efficacy. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. August, p. 1–11, 2016.

GÁNDARA, L.; MAMONE, L.; BOHM, G. C.; BUZZOLA, F.; CASAS, A. Enhancement of photodynamic inactivation of Staphylococcus aureus biofilms by disruptive strategies. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 8, p. 1757–1767, 2017.

GOMEZ, G. F.; HUANG, R.; MACPHERSON, M.; FERREIRA ZANDONA, A. G.; GREGORY, R. L. Photo Inactivation of Streptococcus mutans Biofilm by Violet-Blue light. **Current Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 426–433, 8 Sep 2016. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-016-1075-z>.

HALILOGLU, M.; BILGILI, B.; HALILOGLU, O.; YAVUZ, D. G.; CINEL, I. Original Article Vitamin D level is associated with mortality predictors in ventilator-associated pneumonia caused by Acinetobacter baumannii. **the journal of infection in developing countries**, v. 10, n. 6, 2016.

HSIEH, Y.-H.; ZHANG, J.-H.; CHUANG, W.-C.; YU, K.-H.; HUANG, X.-B.; LEE, Y.-C.; LEE, C.-I. An in Vitro Study on the Effect of Combined Treatment with Photodynamic and Chemical Therapies on Candida albicans. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 337, 2018. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/2/337>.

HUANG, L.; SZEWCZYK, G.; SARNA, T.; HAMBLIN, M. R. Potassium Iodide Potentiates Broad-Spectrum Antimicrobial Photodynamic Inactivation Using Photofrin. **ACS Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 320–328, 2017.

HUANG, Y.; TANAKA, M.; VECCHIO, D.; GARCIA-DIAZ, M.; CHANG, J.; MORIMOTO, Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic Therapy induces an immune response against a bacterial pathogen. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 8, n. 5, p. 479–494, 2012.

HUSE, H. K.; KWON, T.; ZLOSNIK, J. E. a; SPEERT, D. P.; MARCOTTE, E. M.; WHITELEY, M. Pseudomonas aeruginosa enhances production of a non-alginate exopolysaccharide during long-term colonization of the cystic fibrosis lung. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e82621, Jan 2013. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3855792&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 29 sep. 2014.

JORGE, G.; SILVA, D.; DOMINGUES, S. Insights on the Horizontal Gene Transfer of

Carbapenemase Determinants in the Opportunistic Pathogen Acinetobacter baumannii. p. 1–23, 2016.

KALKA, K.; MERK, H.; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **Dermatological Phototherapy and Photodiagnostic Methods**, p. 241–280, 2009.

KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 2, p. 310–347, 2009. Disponível em: <http://mmbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00041-08>.

KAWCZYK-KRUPKA, A.; PUCELIK, B.; MIEDZYBRODZKA, A.; SIERON, A.; DABROWSKI, J. M. Photodynamic therapy as an alternative to antibiotic therapy for the treatment of infected leg ulcers. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.041>.

KIM, M. J.; YUK, H. G. Antibacterial mechanism of 405-nanometer light-emitting diode against Salmonella at refrigeration temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 5, p. 1–14, 2017.

KIM, S. W.; KIM, J. S.; LIM, W. B.; JEON, S. M.; KIM, O. S.; KOH, J.-T.; KIM, C.-S.; CHOI, H. R.; KIM, O. J. In Vitro Bactericidal Effects of 625, 525, and 425nm Wavelength (Red, Green, and Blue) Light-Emitting Diode Irradiation. **Photomediine and laser surgery**, v. 31, n. 11, p. 554–562, 2013.

LEE, H. J.; KANG, S. M.; JEONG, S. H.; CHUNG, K. H.; KIM, B. Il. Antibacterial photodynamic therapy with curcumin and Curcuma xanthorrhiza extract against Streptococcus mutans. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 20, p. 116–119, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.09.003>.

LI, Y. H.; TIAN, X. L. Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms: Bacterial Cooperation and Competition. **Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria**, v. 2, p. 1197–1205, 2016.

MACHADO, R. M.; CARVALHO, D. V.; OLIVEIRA, A. C. De. Aspectos epidemiologicos das infecções hospitalares no centro de terapia intensiva de um hospital universitario. **Revista de enfermagem do centro oeste mineiro**, v. 1, n. 1, p. 9–16, 2011.

MAISCH, T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 14, n. 8, p. 1518–1526, 2015. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5PP00037H>.

MENEGUETI, M. G.; BETONI, N. C.; BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; ROMÃO, E. A. Central venous catheter-related infections in patients receiving short-term hemodialysis therapy: Incidence, associated factors, and microbiological aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 6, p. 783–787, 2017.

METAN, G.; PALA, C.; KAYNAR, L.; CEVAHIR, F.; ALP, E. A nightmare for haematology clinics: extensively drug-resistant (XDR) Acinetobacter baumannnii. **Le infezioni in medicina : rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive**, v. 22, n. 4, p. 277–282, 2014.

MISRA, R.; MORRISON, K. D.; CHO, H. J.; KHUU, T. Importance of real-time assays to

distinguish multidrug efflux pump-inhibiting and outer membrane-destabilizing activities in Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, v. 197, n. 15, p. 2479–2488, 2015.

MIYATA, S.; MIYAJI, H.; KAWASAKI, H.; YAMAMOTO, M.; NISHIDA, E.; TAKITA, H.; AKASAKA, T.; USHIJIMA, N.; IWANAGA, T.; SUGAYA, T. Antimicrobial photodynamic activity and cytocompatibility of Au<inf>25</inf>(Capt)<inf>18</inf> clusters photoexcited by blue LED light irradiation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2703–2716, 2017.

MÜLLER, A.; PREUSS, A.; RÖDER, B. Photodynamic inactivation of Escherichia coli – Correlation of singlet oxygen kinetics and phototoxicity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 178, n. August 2017, p. 219–227, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.11.017>.

NEMEZIO, M. A.; DE SOUZA FARIAS, S. S.; BORSATTO, M. C.; AIRES, C. P.; CORONA, S. A. M. Effect of methylene blue-induced photodynamic therapy on a Streptococcus mutans biofilm model. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 20, n. October, p. 234–237, 2017.

NEVES, F. C.; CLEMENTE, W. T.; LINCOPAN, N.; PAIÃO, I. D.; NEVES, P. R.; ROMANELLI, R. M.; LIMA, S. S. S.; PAIVA, L. F.; MOURÃO, P. H. O.; NOBRE-JUNIOR, V. A. Clinical and microbiological characteristics of OXA-23- and OXA-143-producing Acinetobacter baumannii in ICU patients at a teaching hospital, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 556–563, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2016.08.004>.

NICOL, M.; LUIZET, J.; SKOGMAN, M.; JOUENNE, T.; SALCEDO, S. P.; EMMANUELLE, D. Unsaturated Fatty Acids Affect Quorum Sensing Communication System and Inhibit Motility and Biofilm Formation of Acinetobacter baumannii. **international journal of molecula sciences**, p. 1–10, 2018.

OWLIA, P.; AZIMI, L.; GHOLAMI, A.; ASGHARI, B.; LARI, A. R. resistance in Acinetobacter baumannii : a global threat to burn patients. p. 182–187, 2012.

PAIVA, J.-A.; MERGULHÃO, P.; PEREIRA, J. M. Aspergillus and other respiratory fungal infections in the ICU. **Current Opinion in Infectious Diseases**, p. 1, 2018. Disponível em: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00001432-900000000-99286>.

PATRICK R., M.; KEN S., R.; MICHAEL A., P. **Microbiologia Médica**. 6ª Edição ed. [s.l.] Elsevier, 2014.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. Acinetobacter baumannii: Emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 538–582, 2008.

POURHAJIBAGHER, M.; BOLUKI, E.; CHINIFORUSH, N.; POURAKBARI, B.; FARSHADZADEH, Z.; GHORBANZADEH, R.; AZIEMZADEH, M.; BAHADOR, A. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Modulation of virulence in Acinetobacter baumannii cells surviving photodynamic treatment with toluidine blue. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 15, p. 202–212, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.07.007>.

PRAZMO, E. J.; KWASNY, M.; LAPINSKI, M.; MIELCZAREK, A. Photodynamic Therapy As a Promising Method Used. **Adv. Clin. Exp. Med.**, v. 25, n. 4, p. 799–807, 2016.

QIN, H.; LO, N. W.-S.; LOO, J. F.-C.; LIN, X.; YIM, A. K.-Y.; TSUI, S. K.-W.; LAU, T. C.-K.; IP, M.; CHAN, T.-F. Comparative transcriptomics of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii in response to antibiotic treatments. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 3515, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21841-9>.

RAMANATHAN, S.; ARUNACHALAM, K.; CHANDRAN, S.; SELVARAJ, R.; SHUNMUGIAH, K. P.; ARUMUGAM, V. R. Biofilm inhibitory efficiency of phytol in combination with cefotaxime against nosocomial pathogen Acinetobacter baumannii. **Journal of Applied Microbiology**, p. 0–2, 23 Feb 2018. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.13741>.

ROSA, R. A. da; SANTINI, M. F.; FIGUEIREDO, J. A. P. de; VISIOLI, F.; PEREIRA, J. R.; VIVAN, R. R.; MONTAGNER, F.; SÓ, M. V. R. Effectiveness of photodynamic therapy associated with irrigants over two biofilm models. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 20, p. 169–174, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.10.003>.

ROYER, S.; LUIZA, A.; FARIA, S.; MIYUKI, L.; PAVONI, T.; CHAGAS, G.; AMARAL, P.; CAMPOS, D.; WILLIAM, D.; DUTRA, M.; GONTIJO, P. P.; MARQUES, R. Spread of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa clones in patients with ventilator-associated pneumonia in an adult intensive care unit at a university hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 350–357, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2015.03.009>.

SAH, U.; SHARMA, K.; CHAUDHRI, N.; SANKAR, M.; GOPINATH, P. Antimicrobial photodynamic therapy: Single-walled carbon nanotube (SWCNT)-Porphyrin conjugate for visible light mediated inactivation of Staphylococcus aureus. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 162, p. 108–117, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.11.046>.

SAITAWEE, D.; TEERAKAPONG, A.; MORALES, N. P.; JITPRASERTWONG, P.; HORMDEE, D. Photodynamic therapy of Curcuma longa extract stimulated with blue light against Aggregatibacter actinomycetemcomitans. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 2018. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S157210001830019X>.

SANITÁ, P. V.; PAVARINA, A. C.; DOVIGO, L. N.; RIBEIRO, A. P. D.; ANDRADE, M. C.; MIMA, E. G. D. O. Curcumin-mediated anti-microbial photodynamic therapy against Candida dubliniensis biofilms. **Lasers in Medical Science**, p. 1–9, 2017.

SANTEZI, C.; REINA, B. D.; DOVIGO, L. N. Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections-A Review. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 21, n. January, p. 409–415, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29378256>.

SATO, Y.; UNNO, Y.; UBAGAI, T.; ONO, Y. Sub-minimum inhibitory concentrations of colistin and polymyxin B promote Acinetobacter baumannii biofilm formation. p. 1–18, 2018.

SHACKLEY, D. C.; WHITEHURST, C.; CLARKE, N. W.; BETTS, C.; MOORE, J. V. Photodynamic therapy. **Deri Hastaliklari ve Frengi Arsivi**, v. 33, n. 3, p. 137–148, 1999. Disponível em: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L30225812%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=1019214X&id=doi:&atitle=Photodynamic+

therapy&stitle=Deri.+Hast.+Frengi+Ars.&title=Deri+Hastaliklari+ve+Frengi+Arsivi&volum>.
SKRZAT-KLAPACZYŃSKA, A.; MATŁOSZ, B.; BEDNARSKA, A.; PACIOREK, M.; FIRLĄG-BURKACKA, E.; HORBAN, A.; KOWALSKA, J. D. Factors associated with urinary tract infections among HIV-1 infected patients. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2018.
SÖKMEN, M.; AKRAM KHAN, M. The antioxidant activity of some curcuminoids and chalcones. **Inflammopharmacology**, v. 24, n. 2–3, p. 81–86, 2016.
SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**, v. 5594, n. December, p. 223–229, 2015.
SOUZA, E. S.; BELEI, R. A.; CARRILHO, C. M. D. de M.; MATSUO, T.; YAMADA-OGATTA, S. F.; ANDRADE, G.; PERUGINI, M. R. E.; PIERI, F. M.; DESSUNTI, E. M.; KERBAUY, G. Mortalidade e riscos associados a infecção relacionada à assistência à saúde. **Texto e Contexto Enfermagem**, v. 24, n. 1, p. 220–228, 2015.
SPERANDIO, F. F.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Kill Gram-negative Bacteria. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, v. 8, n. 2, p. 1–23, 2013.
SUBASHCHANDRABOSE, S.; SMITH, S.; DEORNELLAS, V.; CREPIN, S.; KOLE, M.; ZAHDEH, C.; MOBLEY, H. L. T. Acinetobacter baumannii Genes Required for Bacterial Survival during Bloodstream Infection. **mSphere**, v. 1, n. 1, p. e00013-15, 2016. Disponível em: <http://msphere.asm.org/content/1/1/e00013-15.abstract>.
TEGOS, G. P.; MASAGO, K.; AZIZ, F.; HIGGINBOTHAM, A.; STERMITZ, F. R.; HAMBLIN, M. R. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3202–3209, 2008.
TOWNER, K. J. Acinetobacter: an old friend, but a new enemy. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, n. 4, p. 355–363, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2009.03.032>.
TOWNSEND, C. M.; BEAUCHAMP, R. D.; EVERS, B. M.; MATTOX, K. l. Tratado de Cirurgia - A Base Biológica da Prática Cirurgica Moderna. **Tradução Alexandre Maceri Midão Et Al.**, p. 2046, 2015.
TSAI, W. H.; YU, K. H.; HUANG, Y. C.; LEE, C. I. EGFR-targeted photodynamic therapy by curcumin-encapsulated chitosan/TPP nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 903–916, 2018.
TURLIN, E.; HEUCK, G.; SIM??ES BRAND??O, M. I.; SZILI, N.; MELLIN, J. R.; LANGE, N.; WANDERSMAN, C. Protoporphyrin (PPIX) efflux by the MacAB-TolC pump in Escherichia coli. **MicrobiologyOpen**, v. 3, n. 6, p. 849–859, 2014.
VIJAY, G.; MANDAL, A.; SANKAR, J.; KAPIL, A.; LODHA, R.; KABRA, S. K. Ventilator Associated Pneumonia in Pediatric Intensive Care Unit: Incidence, Risk Factors and Etiological Agents. **Indian Journal of Pediatrics**, p. 5–10, 2018.
VIJAYAKUMAR, S.; RAJENDERAN, S.; LAISHRAM, S.; ANANDAN, S.; BALAJI, V.; BISWAS, I. Biofilm Formation and Motility Depend on the Nature of the Acinetobacter baumannii Clinical Isolates. **Frontiers in Public Health**, v. 4, n. May, p. 105, 2016. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpubh.2016.00105>.

WAINWRIGHT, M.; SMALLEY, H.; SCULLY, O.; LOTFIPOUR, E. Comparative Photodynamic Evaluation of New Phenothiazinium Derivatives against Propionibacterium acnes †. n. 10, p. 523–526, 2012.

WINKLER, K.; SIMON, C.; FINKE, M.; BLESES, K.; BIRKE, M.; SZENTMÁRY, N.; HÜTTENBERGER, D.; EPPIG, T.; STACHON, T.; LANGENBUCHER, A.; FOTH, H.; HERRMANN, M.; SEITZ, B.; BISCHOFF, M. Photodynamic inactivation of multidrug-resistant Staphylococcus aureus by chlorin e6 and red light (λ = 670 nm). **Journal of Photochemistry & Photobiology**, v. 162, p. 340–347, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.07.007>.

YANG, M.-Y.; CHANG, K.-C.; CHEN, L.-Y.; WANG, P.-C.; CHOU, C.-C.; WU, Z.-B.; HU, A. Blue light irradiation triggers the antimicrobial potential of ZnO nanoparticles on drug-resistant Acinetobacter baumannii. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, n. 2017, 2018. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134417313222>.

YEO, H. J.; YOON, S. H.; LEE, S. E.; CHO, W. H.; KIM, D.; JEON, D.; SHIN, K.-H.; KIM, Y. S. Bacterial Biofilms on Extracorporeal Membrane Oxygenation Catheters. **American society of artificial internal organs**, 2018.

YUAN, Y.; LIU, Z.-Q.; JIN, H.; SUN, S.; LIU, T.-J.; WANG, X.; FAN, H.-J.; HOU, S.-K.; DING, H. Photodynamic antimicrobial chemotherapy with the novel amino acid-porphyrin conjugate 4I: In vitro and in vivo studies. **PloS one**, v. 12, n. 5, p. e0176529, 2017.

ZINNE, N.; KRUEGER, M.; HOELTIG, D.; TUEMMLER, B.; BOYLE, E. C.; BIANCOSINO, C.; HOEFFLER, K.; BRAUBACH, P.; RAJAB, T. K.; CIUBOTARU, A.; ROHDE, J.; WALDMANN, K.-H.; HAVERICH, A. Treatment of infected lungs by ex vivo perfusion with high dose antibiotics and autotransplantation: A pilot study in pigs. **Plos One**, v. 13, n. 3, p. e0193168, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29505574%0Ahttp://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0193168>.

Figuras e Legendas

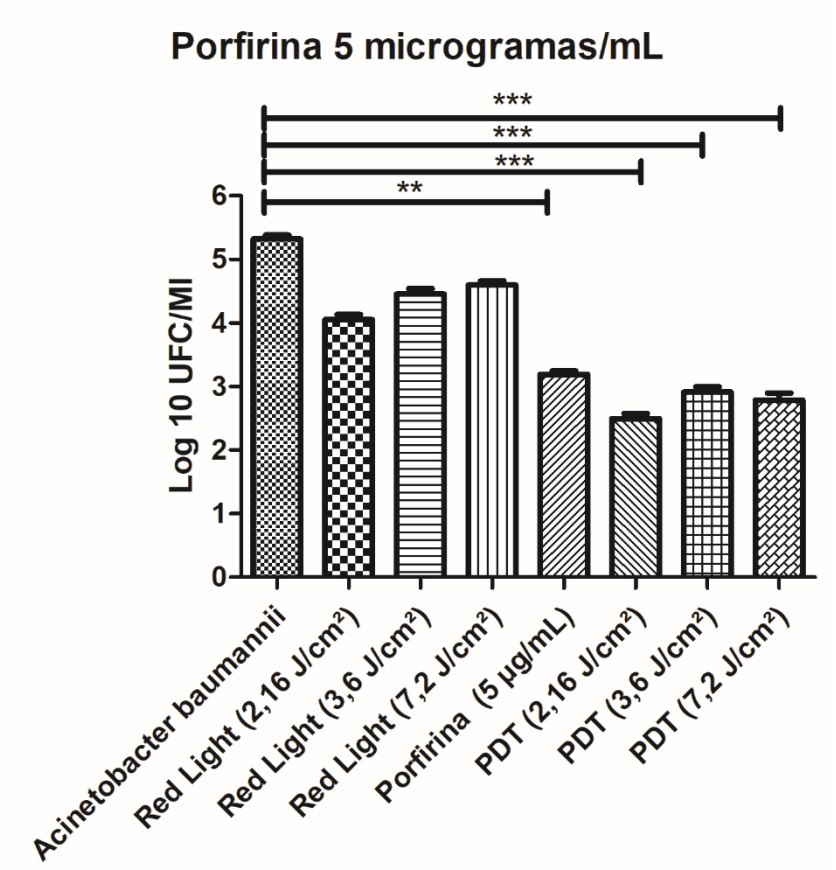

Figura 1. Medias expressas em log 10 UFC/mL e desvio padrão (barras de erro) obtidos com o teste de Kruskall-Wallis e pós-teste de Dunn (5%) para os grupos experimentais tratados com PDT porfirina (5 µg/mL). * = diferença estatística. P valor <0,01=**; P-valor<0,001=***

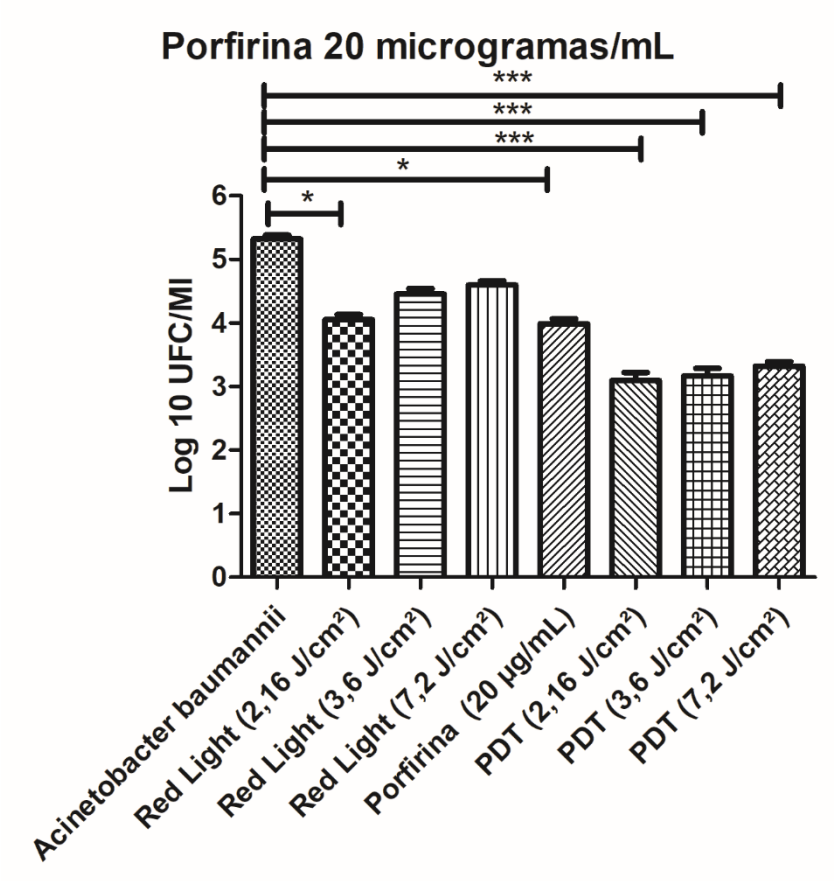

Figura 2- Medias expressas em log 10 UFC/mL e desvio padrão (barras de erro) obtidos com o teste de Kruskall-Wallis e pós-teste de Dunn (5%) para os grupos experimentais tratados com PDT porfirina (20 µg/mL). * = diferença estatística. P valor <0,05=*; P-valor<0,001=***

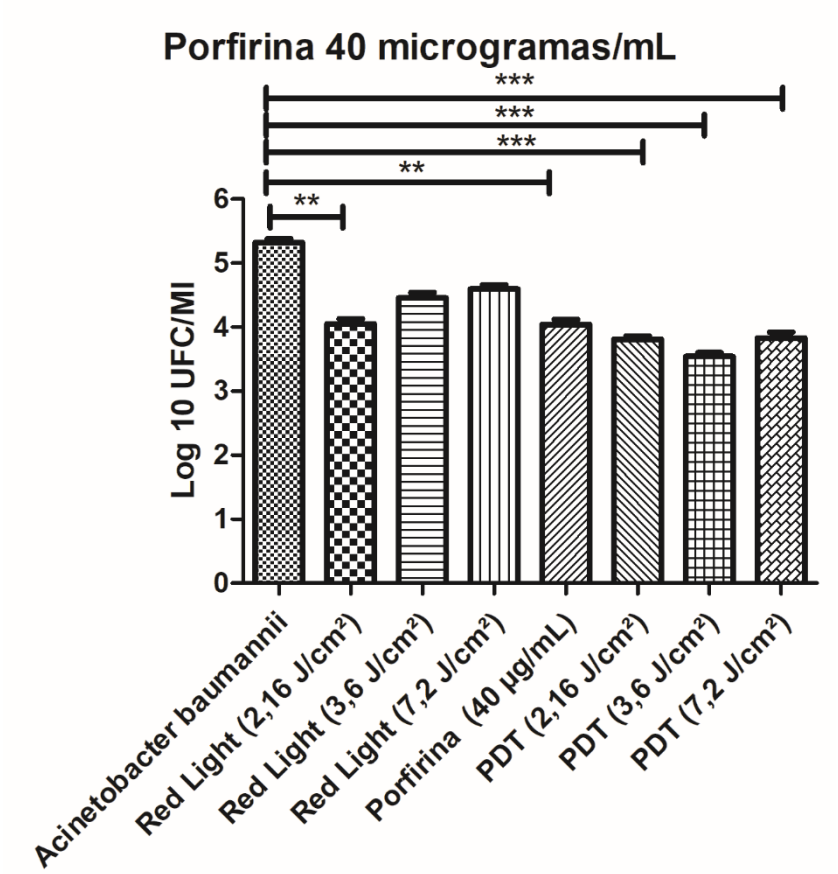

Figura 3- Medias expressas em log 10 UFC/mL e desvio padrão (barras de erro) obtidos com o teste de Kruskall-Wallis e pós-teste de Dunn (5%) para os grupos experimentais tratados com PDT porfirina (40 µg/mL). * = diferença estatística. P valor <0,01=**; P-valor<0,001=***

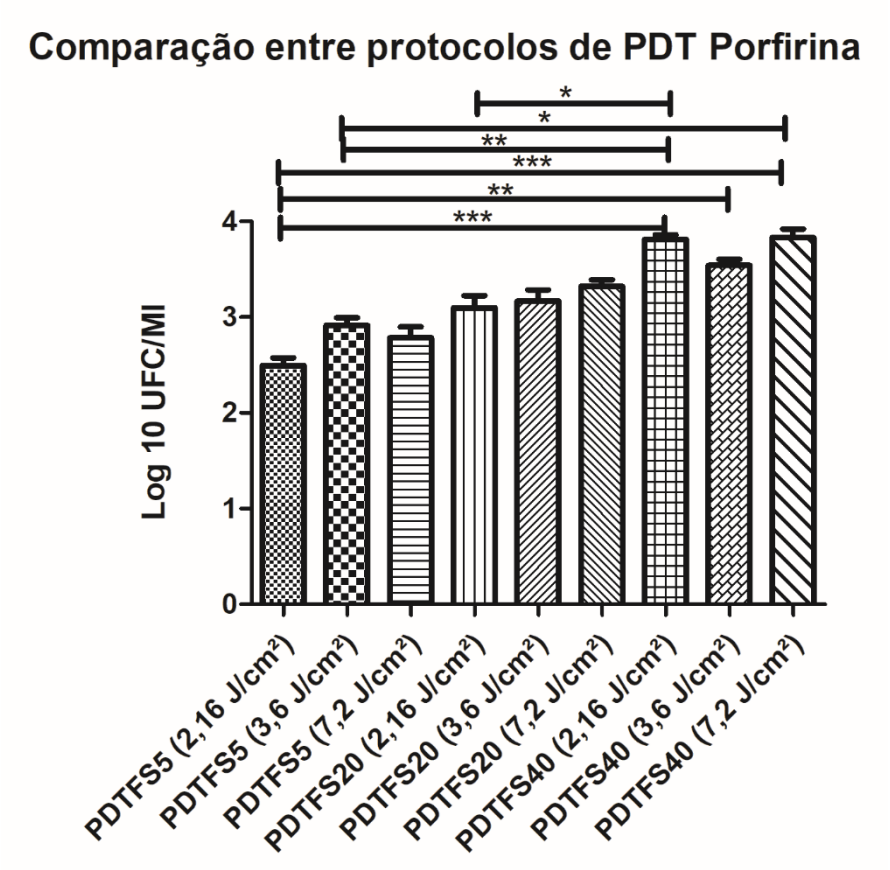

Figura 4- Medias expressas em log de 10 UFC/mL e desvio padrão (barras de erro) obtidos com o uso do teste não-paramétrico de Kruskall-Wallis e pós-teste Dunn (5%) para os grupos experimentais do TFD. * = diferença estatística. P-valor<0,05=* ;P valor <0,01=**; P-valor<0,001=***

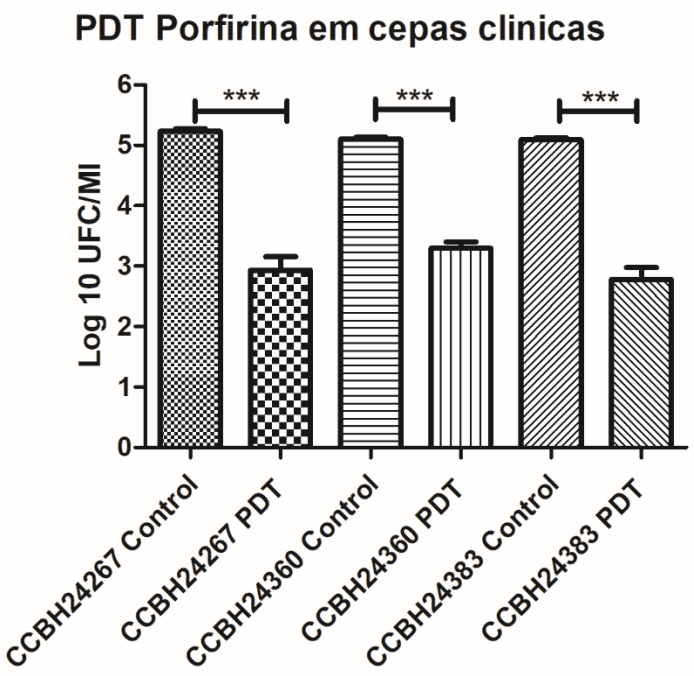

Figura 5- Médias expressas em log de 10 UFC/mL e desvio padrão (barras de erro) obtidas pelo teste de Mann-Whitney (95%) para cepas clínicas de A. baumannii (CCBH24267, CCBH24360 E CCBH24383) tratadas com PDT porfirina (5 µg/mL) e dose de 2,16 J/cm². * = diferença estatística. P-valor<0,001=***

5. CAPITULO 2

Avaliação *in vitro* da atividade bactericida de diferentes protocolos de Terapia Fotodinâmica mediada por curcumina frente a biofilmes de *Acinetobacter baumannii*

Abstract:

Objetivos: Avaliar a efetividade bactericida *in vitro* de diferentes protocolos de terapia fotodinâmica (PDT) utilizando o fotossensibilizante (FS) curcumina frente a biofilmes de cepas padrão e clinicas de *Acinetobacter baumannii.*

Materiais e métodos: Foram utilizados 160 corpos-de-prova (CP) de resina acrílica para a formação dos biofilmes que foram introduzidos individualmente em poços de placas de cultura de células de 24 poços acrescidos de 1 mL do meio de cultura caldo BHI e 100 µL de suspensão de *A. baumannii* padronizada em espectrofotômetro. As placas foram incubadas por 7 dias a 36º C. Após esse período os CPs foram divididos em grupos (n = 10) de acordo com a concentração do FS (5 µg/mL; 20 µg/mL; 40 µg/mL) e tempo de irradiação com a luz (3, 5 e 10 minutos). Foi utilizado LED de 460 nm com intensidade de 18 mW/cm^2 e fluências de 3,24 J/cm^2; 5,4 J/cm^2 e 10,8 J/cm^2 de acordo com os tempos já descritos. Grupos controle em que nenhum tratamento foi realizado, grupos tratados somente com o FS nas diferentes concentrações e grupos tratados somente com luz LED nos diferentes tempos foram realizados. Após os tratamentos foram obtidas diluições decimais por meio de agitação dos CPs que foram semeadas em duplicata em placas de Petri contendo meio ágar BHI e incubadas durante 24 horas a 36º C sendo realizada a contagem de UFC/mL. A comparação entre os grupos foi realizada pelo este estatístico Kruskall-Wallis com pós-teste de Dunn (95%)

Resultados: Os grupos PDT com o FS na concentração de 40 µg/mL ativado com dose de 10,8 J/cm^2 reduziu de maneira significativa ($p < 0,05$) o log10 UFC/mL da cepa padrão de *A. baumannii* e quando comparado a outros

protocolos, se mostrou o mais eficiente. Este protocolo de PDT com o FS na concentração de 40 µg/mL e irradiação com a dose de 10,8 J/cm² foi utilizado para os testes frente a três cepas clinicas de *A. baumannii* mostrando redução estatística significativa ($p < 0,05$) no log10 UFC/mL quando comparadas aos seus grupos controles.

Conclusão: Os protocolos de PDT, utilizando a curcumina como fotossensibilizante, testados neste trabalho, mostraram eficiência bactericida frente a biofilmes de cepas padrão e clinicas de *A. baumannii* sendo o protocolo com o FS na concentração de 40 µg/mL e irradiação com dose de 10,8 J/cm² foi o mais efetivo.

Palavras chaves: Infecção hospitalar; Biofilm ;*Acinetobacter baumannii* ;Terapia fotodinâmica; Curcumina;

Introdução

Infecções no ambiente hospitalar têm sido responsáveis por grandes números de morbidade e mortalidade. Na atualidade, além do comprometimento da saúde do indivíduo essas infecções estão associadas a grandes custos no sistema público de saúde no mundo todo (MACHADO; CARVALHO; OLIVEIRA, 2011). Indivíduos hospitalizados que estejam imunocomprometidos ou usando equipamentos hospitalares como cateteres e ventilação mecânica fazem parte do grupo de risco (OWLIA et al., 2012; MENEGUETI et al., 2017; VIJAY et al., 2018).

Atualmente, *Acinetobacter baumannii* é um dos principais patógenos causadores de infecções no ambiente hospitalar (BEREZIN; SOLÓRZANO, 2014), sendo uma bactéria gram-negativa, com forma celular pleomorfica, também chamada de cocobacillus, aeróbia obrigatório. Um dos principais problemas no tratamento de infecções causadas por este patógeno é a existência de cepas com susceptibilidade reduzida a antibioticoterapia (ALP et al., 2017). Nos diversos ambientes hospitalares pelo mundo já são encontradas cepas de *A. baumannii* com multirresistência a antibióticos (MDR) e até mesmo extensiva-resistência a antibióticos (XDR) (CEREZALES et al., 2018).

Outra dificuldade encontrada é a expressão de fatores de virulência que tornam o seu controle mais difícil, por exemplo, induzindo a produção de estruturas de defesa, tais como o biofilme (YEO et al., 2018). Essas bactérias produzem substâncias extracelulares poliméricas (EPS's) que formam uma camada que cobre as bactérias, além de aderir as bactérias umas às outras e fixar as mesmas em superfícies bióticas e abióticas. O biofilme acaba por ficar as bactérias em equipamentos de ventilação mecânica e cateteres (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018). Além das funções descritas acima, os biofilmes ainda podem proteger os microrganismos da ação de antibióticos, gerando camadas impermeáveis à passagem dos mesmos (SOTO, 2015).

Devido a grande dificuldade no controle de infecções hospitalares, principalmente as causadas por bactérias resistentes a antibioticoterapia, a busca de novos fármacos ou estratégias são necessárias. Os experimentos de Oscar Raab, em 1900, evidenciaram um efeito microbicida promovido pela luz em estudos com *Paramecium spp.* Esse evento deu início aos estudos da técnica de Terapia fotodinâmica (Photodynamic Therapy (PDT)) (KALKA; MERK; MUKHTAR, 2009).

A PDT faz uso de irradiação luminosa de adequado comprimento de onda associada a corantes fotossensibilizantes para promover a morte não tóxica de microrganismos na presença de oxigênio (PRAZMO et al., 2016). Diversos corantes fotossensibilizantes já foram estudados como a porfirina, azul de metileno, azul de toluidina, clorinas, dentre outros (HUANG et al., 2012; WAINWRIGHT et al., 2012; BOLUKI et al., 2017; MIYATA et al., 2017) . Atualmente a curcumina é largamente utilizada sendo um fotossensibilizante com ação bactericida relatada em estudos científicos.

A curcumina é um composto fenólico, membro da família cucuminoide, que é derivado da *Curcuma longa*, também conhecido como Açafrão-da-Índia. A curcumina possui grande potencial medicinal para aplicação, pois possui atividade anti-inflamatória, anti-septica, anti-viral e anti-tumoral (ALI; BANERJEA, 2016; SÖKMEN; AKRAM KHAN, 2016; TSAI et al., 2018). Este composto se mostra como um bom fotossensibilizante por absorver luz no espectro visível do azul (SANTEZI; REINA; DOVIGO, 2018). Entretanto, o estudo do seu uso no combate a *A. baumannii* em modelo de biofilme é pouco estudado.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes protocolos de terapia fotodinâmica antimicrobiana para *A. baumannii* (ATCC 19606) utilizando a curcumina como fotossensibilizante, nas concentrações de 5 µg/ml, 20 µg/ml e 40 µg/ml e utilizar um dos melhores protocolos para uso em 3 cepas clinicas de *A. baumannii* (CCBH24267, CCBH24360 e CCBH24383).

Materiais e métodos

Confecção dos corpos-de-prova

Para o desenvolvimento do presente estudo foram utilizados como corpos-de-prova 160 discos de resina acrílica ativada quimicamente (RAAQ) (TDV Dental Ltda. Pomerode, SC, Brasil) medindo 6,4 mm de diâmetro e 3 mm de altura. Os corpos-de-prova foram esterilizados em autoclave a 121º C por 15 minutos.

Cultivo do microrganismo e formação do biofilme

Foram utilizadas cepas padrão de *Acinetobacter Baumannii* INCQS 00143 (ATCC 19606) provenientes da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária-CMRVS (FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e cepas clínicas de *A. baumannii* da Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar (CCBH) (FIOCRUZ-CCBH, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) das linhagens CCBH24267, CCBH24360 e CCBH24383.

A ativação do microrganismo foi feita em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Himedia Laboratories, Mumbai, India) por 24 horas a 35º $\pm$ 2º C em estufa B.O.D. Após a ativação, 100 µl do crescimento foi semeado em placas de Petri contendo ágar BHI (Himedia Laboratories, Mumbai, India) e incubadas por 24 horas a 35º $\pm$ 2º C em estufa B.O.D. Após incubação, foi obtida uma suspensão padronizada em $1X10^6$ células/mL por espectrofotometria.

No interior do fluxo laminar, foram preparadas placas de cultura de células de 24 poços estéreis, dos quais 10 poços foram preenchidos com 3 ml de meio de cultura caldo BHI (Himedia Laboratories, Mumbai, India) onde foi adicionado

o microrganismo e um corpo-de-prova de RAAQ foi imergido em cada poço. As placas foram vedadas e incubadas a 35º ± 2º C por 7 dias para a formação dos biofilmes, e durante o período de incubação as condições de cultivo (umidade e nutrição) foram verificadas diariamente.

Fotossensibilizante e fonte de luz

Foi utilizado o FS curcumina [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona] (PDT Pharma Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos LTDA, Cravinhos, SP, Brasil) preparado pela diluição do pó em água destilada estéril para a obtenção das concentrações de 5 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL. Para a iluminação dos corpos de prova foi utilizado o equipamento Biotable® RGB (MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) que consiste em uma mesa iluminadora de LEDs com os comprimentos de onda de 460, 530 e 630 nm. Os LEDs são arranjados de maneira que cada poço seja iluminado por um LED permitindo produzir iluminação uniforme em toda placa. No estudo em questão foi utilizado o LED azul (460 nm), irradiância de 18 mW/cm^2, nos tempos de 3 minutos, 5 minutos e 10 minutos, gerando fluências de 3,24 J/cm², 5,4 J/cm² e 10,8 J/cm², respectivamente.

Procedimentos experimentais

Os corpos-de-prova com o crescimento dos biofilmes foram lavados por 15 segundos em 1 mL de soro fisiológico estéril para remoção do excesso de meio de cultura. Após esse período foram transferidos para poços de placa de cultura de células contendo 1ml do FS utilizado por 5 minutos (período pré-irradiação) em uma das concentrações descritas (5, 20 ou 40 µg/mL), em ambiente escuro. Após o período os corpos-de-prova foram transferidos para novos poços e realizada a irradiação com LED nos tempos estipulados (90, 300 ou 600 segundos). Após a irradiação, os corpos de prova foram introduzidos individualmente em eppendorfs estéreis de 1,5 ml contendo soro fisiológico estéril e agitados em aparelho agitador de tubos tipo vortex durante 1 minuto.

Após agitação, as soluções foram diluídas e em sequência semeadas em duplicata, em placas de Petri contendo meio de cultura agar BHI (Himedia Laboratories, Mumbai, India) e incubadas a 35º ± 2ºC durante 24 horas. Após o período de incubação foi realizada contagem de UFC/ml. Foram inclusos grupos controle em que nenhum tratamento foi realizado, grupos em que somente o FS nas diferentes concentrações foram testados e grupos em que somente as luzes nos diferentes tempos de iluminação foram avaliados. Os grupos foram formados por 10 corpos-de-prova para cada teste realizado.

O melhor protocolo obtido foi testado para as cepas clínicas já mencionadas.

Análise estatística

Os dados referentes a unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foram transformados em log10. Os pressupostos de normalidade e homogeneidade foram verificados através do teste estatístico de Shapiro-Wilk. Foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskall-Wallis (95%) com pós-teste de Dunn para comparação entre os grupos experimenteis de cepas ATCC. Para as comparações da efetividade do melhor protocolo de PDT em cepas clínicas foi utilizado o teste Mann-Whitney (95%).

Resultados

Foram realizados protocolos utilizando a curcumina como FS em diferentes concentrações como 5 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL, sendo ativadas por luz de LED azul, recebendo doses de 3,24 J/cm², 5,4 J/cm² e 10,8 J/cm². A figura 1 expõe os resultados dos protocolos realizados com a concentração do FS a 5 µg/mL. Os dados mostram que quando comparados ao controle de crescimento bacteriano, apenas o protocolo irradiado com a dose de 10,8 J/cm² foi eficiente na redução do log10 UFC/ml ($p<0,05$).

A figura 2 mostra os resultados da PDT com o FS a 20 µg/mL. Ao analisar o gráfico é possível observar que os grupos que obtiveram maiores doses, como

5,4 J/cm² e 10,8 J/cm², foram muito eficientes em reduzir o número de UFC's de *A. baumannii* no modelo de PDT em biofilme ($p<0,01$). Quando analisado os protocolos de PDT que utilizaram o FS a 40 µg/mL (figura 3), é possível observar que o protocolo que utilizou a dose de 10,8 L/cm² reduziu de maneira muito significativa ($p<0,001$) a carga bacteriana de *A. baumannii*. O protocolo que utilizou a dose de 3,24 J/cm² também se mostrou eficiente na redução da carga bacteriana ($p<0,05$). O protocolo que recebeu a dose de 5,4 J/cm² não demonstrou atividade antibacteriana significativa.

A figura 4 nos mostra o resultado das comparações realizadas entre todos os protocolos testados neste trabalho na tentativa de evidenciar algum destes. A figura nos mostra que houve um protocolo que se destacou entre todos os protocolos testados quanto ao maior potencial de redução do log 10 UFC/mL, assim, se diferenciando significativamente da maioria dos outros protocolos. O protocolo em questão foi o testado com o FS a 40 µg/mL ativado pela dose de 10,8 J/cm² de LED azul (*=$p<0,05$; **=$p<0,01$). Desta maneira, este protocolo foi eleito o melhor dentre todos os protocolos testados neste trabalho.

O protocolo de PDT com a curcumina na concentração de 40 µg/mL ativado por luz LED azul com dose de 10,8 J/cm² foi aplicado em três cepas clinicas de *A. baumannii* para testar a eficiência do tratamento em bactérias circulantes em ambientes hospitalares (figura 5). Este protocolo, assim como teve ação antibacteriana eficiente na cepa ATCC 19606, foi eficiente na redução do número de log10 UFC/mL das três cepas clinicas de *A. baumannii* testadas quando comparadas aos grupos controles de crescimento ($p<0,001$).

Discussão

O estabelecimento de protocolos para o controle de espécies bacterianas de grande importância clínica, como o desenvolvido neste trabalho, é muito importante para o avanço médico. A formação de biofilme em equipamentos da ala hospitalar por *A. baumannii* está diretamente relacionada com o surgimento de casos de infecções hospitalares com altas taxas de mortalidade (ROYER et

al., 2015; NEVES et al., 2016; YEO et al., 2018). *A. baumannii* tem sido apontado recentemente como um dos principais causadores de infecções hospitalares , causando quadros de infecções na pele, em queimaduras, trato respiratório, infecções em tecidos moles e menigite(ESPINAL; MARTÍ; VILA, 2012; PATRICK R.; KEN S.; MICHAEL A., 2014; VIJAYAKUMAR et al., 2016).

A curcumina é um fotossensibilizante amplamente utilizado na PDT, tanto para tratamento de câncer quanto para ação antimicrobiana, com ação comprovada em diversos trabalhos (ALMEIDA et al., 2017; DE AGUIAR COLETTI et al., 2017; LEE et al., 2017; SANITÁ et al., 2017; HSIEH et al., 2018; TSAI et al., 2018). Neste trabalho, foram estabelecidos protocolos de PDT em um modelo de biofilme formado por *A. baumannii* baseado em três concentrações diferentes de curcumina, sendo elas, ativadas com três doses diferentes de luz azul (3,24 J/cm²; 5,4 J/cm² e 10,8 J/cm²).

Alguns protocolos de PDT testados se mostraram efetivos na redução da carga bacteriana no biofilme formado por *A. baumannii.* Para o funcionamento da PDT antibacteriana, o fotossensibilizante tem de ser absorvido pela bactéria alvo e então será energizado pela luz, gerando as reações responsáveis pela morte do alvo (PRAZMO et al., 2016).

A PDT é uma técnica que tem sido abordada em muitos trabalhos científicos recentes com a intenção do controle de diversas espécies bacterianas (BETTS et al., 2016; GÁNDARA et al., 2017; NEMEZIO et al., 2017; ARAÚJO et al., 2018; SAITAWEE et al., 2018). Fatores, como o uso de luz azul, implicam diretamente na inativação de bactérias, o que tem sido abordado em diferentes trabalhos(BITRIAN et al., 2013; DE SOUSA et al., 2015; GOMEZ et al., 2016). A incidência da luz azul nas bactérias modula a expressão de genes envolvidos com a replicação do DNA cromossomal, o que inativa a bactéria(CHUI et al., 2012).

Os tratamentos que receberam apenas a luz azul mostram que, quando comparadas ao controle, apesar de não ser detectada diferenças estatísticas significativa, as doses 3,24 J/cm² e 5,4 J/cm² induziram a um leve aumento e o grupo tratado com 10,8 J/cm² induziu a uma leve redução da carga bacteriana.

Talvez esse resultado tenha ocorrido por variações na modulação da expressão gênica de *A. baumannii* a depender da dose de luz utilizada.

A energização do fotossensibilizante pela luz, dentro da bactéria alvo, irá produzir espécies reativas de oxigênio, que são toxicas ao microrganismo, e então irão danificar componentes celulares, dentre eles, o material genético. A produção dessas espécies pode ocorrer por dois tipos de reação. A reação de tipo I que ocorre a partir da interação entre o fotossensibilizante em seu estado tripleto com a estrutura alvo, por exemplo, uma membrana celular (PRAZMO et al., 2016). E a reação do tipo II, que ocorre diretamente com o oxigênio, produzindo a molécula de oxigênio singleto (HUANG et al., 2017).

. Neste trabalho, foi possível observar que a medida em que aumentamos a concentração da curcumina, a eficiência da terapia antibacteriana foi aumentando. O tratamento com a concentração de 5 µg/Ml obteve apenas um tratamento com eficiência na redução da carga bacteriana de *A. baumannii*. Entretanto, quando analisado o protocolo com 20 µg/Ml, a carga bacteriana é reduzida em maior número, e em maior número de protocolos, quando comparada ao controle bacteriano. O mesmo padrão ocorre no tratamento com a concentração 40 µg/Ml, onde a redução, principalmente no tratamento com a dose de 10,8 J/cm² foi altamente significativa quando comparada ao controle.

Bactérias gram-negativas, como *A. baumannii*, possuem características estruturais, como ter duas membranas, camadas de peptideoglicano e o lipopolissacarideo, o que as torna menos porosas. Isso dificulta a entrada do fotossensibilizante e consequentemente a efetividade da terapia fotodinâmica(SPERANDIO; HUANG; HAMBLIN, 2013; MÜLLER; PREUSS; RÖDER, 2018). Uma outra possível barreira para a PDT antibacteriana é que, o biofilme, através de sua estrutura, consegue proteger as bactérias de antibióticos e desinfetantes, mecanismo que talvez possa também atrapalhar a absorção do fotossensibilizante (KARATAN; WATNICK, 2009).

Neste trabalho, quando comparada a efetividade entre os protocolos de PDT, observamos que o protocolo tratado com a maior concentração de curcumina e maior dose, obteve o melhor resultado na redução da carga bacteriana. É possível que este ocorrido se deve ao maior gradiente de

concentração estabelecido pelo uso da curcumina a 40 µg/mL, a maior concentração utilizada neste trabalho. A maior concentração deste componente pode ter facilitado a sua entrada na célula bacteriana, contornando as barreiras impostas pela estrutura celular de bactérias gram-negativas, o que otimizou a ação da terapia.

A PDT se mostra como uma importante alternativa para o tratamento de infecções no futuro. Essa esperança existe devido à dificuldade encontrada no tratamento de infecções causadas por patógenos com resistência a antibióticos, que têm sido um grande desafio atualmente (MAISCH, 2015). Utilizando a curcumina como fotossensibilizante para a PDT, Almeida e colaboradores (2017), verificaram que em modelo de infecção intradérmica com *Staphylococcus aureus* em camundongos, a PDT com dose de 54 J/cm², foi muito eficiente na redução da carga bacteriana.

O uso do extrato de *Curcuma longa* em pequenas concentrações, como 0,78 µg/Ml, ativada por dose de 16,8 J/cm², foi capaz de eliminar culturas em placa de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (SAITAWEE et al., 2018). Estudos verificaram que quando *Streptococcus mutans,* em meio liquido, foi tratada com PDT utilizando a curcumina (10 ng/Ml) e dose de 25,3 J/cm², reduziu totalmente a carga bacteriana dessa bactéria(LEE et al., 2017).

Sabendo da importância clínica de patógenos como *A. baumannii*, é importante que as barreiras entre os protocolos desenvolvidos em laboratórios e ambiente clinico comecem a ser ultrapassados. Sendo assim, testamos o protocolo que mais se mostrou eficiente em três cepas isoladas em ambiente clinico. O protocolo de PDT utilizando a curcumina a 40 µg/Ml com a dose de 10,8 J/cm² foi escolhido e aplicado nas cepas CCBH24267, CCBH24360 e CCBH24383 de *A. baumannii*.

Assim como o protocolo foi eficiente na redução da carga bacteriana da cepa ATCC 19606, ele se mostrou muito eficiente quando avaliada a sua ação nas cepas clinicas. Todas as cepas bacterianas testadas tiveram grande redução significativa da carga bacteriana com o protocolo aplicado quando comparado ao controle de cada cepa, mostrando que esta terapia pode ser aplicada em diferentes cepas e também em ambientes clínicos.

Mesmo obtendo bons resultados nesta pesquisa, mais estudos são necessários para aperfeiçoar o conhecimento e identificar a reação da bactéria quanto ao nível de concentração do fotossensibilizante e os índices de espécies reativas de oxigênio produzidas pela reação da PDT. Mais estudos como este poderiam ajudar a explicar de maneira mais clara a relação encontrada neste trabalho, entre o uso de maiores concentrações e maiores doses para a obtenção de maiores reduções da carga bacteriana.

Conclusão

- A PDT se mostrou uma ótima ferramenta no controle da carga bacteriana de biofilmes formados por *A. baumannii.*
- Apesar da estrutura da bactéria ser menos porosa e possivelmente dificultar a entrada de componentes como a curcumina, alguns protocolos testados apresentaram boa redução na carga bacteriana do biofilme. Entretanto, foram apresentadas variações na redução entre esses grupos, o que exigem mais estudos para total compreensão deste evento.
- O protocolo estabelecido com a curcumina a 40 µg/Ml ativado por luz azul (10,8J/cm²), se mostrou altamente eficiente na redução da carga bacteriana. De modo que, o mesmo poderia ser aplicado tanto em feridas superficiais, que estariam no alcance da PDT, como na sanitização de equipamentos usados no ambiente hospitalar para o controle das bactérias formadoras de biofilme.
- O protocolo de 40 µg/Ml com a dose de 10,8 J/cm² foi testado e se mostrou eficiente na redução da carga bacteriana de cepas de *A. baumannii* isoladas em ambientes clínicos. Sendo assim, este protocolo poderia ser testado futuramente, em PDT para o tratamento e sanitização de bactérias patogênicas presentes no ambiente hospitalar.

Referências

ALAV, I.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **Journal of Antimicrobiology Chemotherapy**, n. March, 2018.

ALI, A.; BANERJEA, A. C. Curcumin inhibits HIV-1 by promoting Tat protein degradation. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–9, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep27539>.

ALMEIDA, P. P.; PEREIRA, Í. S.; RODRIGUES, K. B.; LEAL, L. S.; MARQUES, A. S.; ROSA, L. P.; DA SILVA, F. C.; DA SILVA, R. A. A. Photodynamic therapy controls of Staphylococcus aureus intradermal infection in mice. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 6, p. 1337–1342, 2017.

ALP, E.; EREN, E.; ELAY, G.; CEVAHIR, F.; ESMAOĞLU, A.; RELLO, J. Efficacy of loading dose of colistin in Acinetobacter baumannii ventilator-associated pneumonia. **Infezioni in Medicina**, v. 25, n. 4, p. 311–319, 2017.

ARAÚJO, T. S. D.; RODRIGUES, P. L. F.; SANTOS, M. S.; DE OLIVEIRA, J. M.; ROSA, L. P.; BAGNATO, V. S.; BLANCO, K. C.; DA SILVA, F. C. Reduced methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilm formation in bone cavities by photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 219–223, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.12.011>.

BEREZIN, E. N.; SOLÓRZANO, F. Gram-negative infections in pediatric and neonatal intensive care units of Latin America. **Journal of infection in developing countries**, v. 8, n. 8, p. 942–53, Jan 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25116658>. Acesso em: 12 sep. 2014.

BETTS, J. W.; SHARILI, A. S.; LA RAGIONE, R. M.; WAREHAM, D. W. In Vitro Antibacterial Activity of Curcumin-Polymyxin B Combinations against Multidrug-Resistant Bacteria Associated with Traumatic Wound Infections. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 6, p. 1702–1706, 2016.

BITRIAN, M.; GONZÁLEZ, R. H.; PARIS, G.; HELLINGWERF, K. J.; NUDEL, C. B. Blue-light-dependent inhibition of twitching motility in Acinetobacter baylyi ADP1: Additive involvement of three BLUF-domain-containing proteins. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 159, n. PART 9, p. 1828–1841, 2013.

BOLUKI, E.; KAZEMIAN, H.; PEERIDOGAHEH, H.; ALIKHANI, M. Y.; SHAHABI, S.; BEYTOLLAHI, L.; GHORBANZADEH, R. Antimicrobial activity of photodynamic therapy in combination with colistin against a pan-drug resistant Acinetobacter baumannii isolated from burn patient. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 1–5, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.01.003>.

CEREZALES, M.; OCAMPO-SOSA, A. A.; ÁLVAREZ MONTES, L.; DÍAZ RÍOS, C.; BUSTAMANTE, Z.; SANTOS, J.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; HIGGINS, P. G.; GALLEGO, L. High Prevalence of Extensively Drug-Resistant Acinetobacter baumannii at a Children Hospital in Bolivia. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, p. 1, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29474260%0Ahttp://Insights.ovid.com/crossref?an=00006454-900000000-96728>.

CHUI, C.; HIRATSUKA, K.; AOKI, A.; TAKEUCHI, Y.; ABIKO, Y.; IZUMI, Y. Blue LED inhibits the growth of Porphyromonas gingivalis by suppressing the expression of genes associated with DNA replication and cell division. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 44, n. 10, p. 856–864, 2012.

DE AGUIAR COLETTI, T. M. S. F.; DE FREITAS, L. M.; ALMEIDA, A. M. F.; FONTANA, C. R. Optimization of Antimicrobial Photodynamic Therapy in Biofilms by Inhibiting Efflux Pump. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 35, n. 7, p. 378–385, 2017. Disponível em: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/pho.2016.4246>.

DE SOUSA, N. T. A.; SANTOS, M. F.; GOMES, R. C.; BRANDINO, H. E.; MARTINEZ, R.; DE JESUS GUIRRO, R. R. Blue Laser Inhibits Bacterial Growth of *Staphylococcus aureus* , *Escherichia coli,* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 33, n. 5, p. 278–282, 2015. Disponível em: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/pho.2014.3854>.

ESPINAL, P.; MARTÍ, S.; VILA, J. Effect of biofilm formation on the survival of Acinetobacter baumannii on dry surfaces. **Journal of Hospital Infection**, v. 80, n. 1, p. 56–60, 2012.

GÁNDARA, L.; MAMONE, L.; BOHM, G. C.; BUZZOLA, F.; CASAS, A. Enhancement of photodynamic inactivation of Staphylococcus aureus biofilms by disruptive strategies. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 8, p. 1757–1767, 2017.

GOMEZ, G. F.; HUANG, R.; MACPHERSON, M.; FERREIRA ZANDONA, A. G.; GREGORY, R. L. Photo Inactivation of Streptococcus mutans Biofilm by Violet-Blue light. **Current Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 426–433, 8 Sep 2016. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-016-1075-z>.

HSIEH, Y.-H.; ZHANG, J.-H.; CHUANG, W.-C.; YU, K.-H.; HUANG, X.-B.; LEE, Y.-C.; LEE, C.-I. An in Vitro Study on the Effect of Combined Treatment with Photodynamic and Chemical Therapies on Candida albicans. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 337, 2018. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/2/337>.

HUANG, L.; SZEWCZYK, G.; SARNA, T.; HAMBLIN, M. R. Potassium Iodide Potentiates Broad-Spectrum Antimicrobial Photodynamic Inactivation Using Photofrin. **ACS Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 320–328, 2017.

HUANG, Y.; TANAKA, M.; VECCHIO, D.; GARCIA-DIAZ, M.; CHANG, J.; MORIMOTO, Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic Therapy induces an immune response against a bacterial pathogen. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 8, n. 5, p. 479–494, 2012.

KALKA, K.; MERK, H.; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **Dermatological Phototherapy and Photodiagnostic Methods**, p. 241–280, 2009.

KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 2, p. 310–347, 2009. Disponível em: <http://mmbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00041-08>.

LEE, H. J.; KANG, S. M.; JEONG, S. H.; CHUNG, K. H.; KIM, B. Il. Antibacterial photodynamic therapy with curcumin and Curcuma xanthorrhiza extract against Streptococcus mutans. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 20, p. 116–119, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.09.003>.

MACHADO, R. M.; CARVALHO, D. V.; OLIVEIRA, A. C. De. Aspectos epidemiologicos das infecções hospitalares no centro de terapia intensiva de um hospital universitario. **Revista de enfermagem do centro oeste mineiro**, v. 1, n. 1, p. 9–16, 2011.

MAISCH, T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 14, n. 8, p. 1518–1526, 2015. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5PP00037H>.

MENEGUETI, M. G.; BETONI, N. C.; BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; ROMÃO, E. A. Central venous catheter-related infections in patients receiving short-term hemodialysis therapy: Incidence,

associated factors, and microbiological aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 6, p. 783–787, 2017.

MIYATA, S.; MIYAJI, H.; KAWASAKI, H.; YAMAMOTO, M.; NISHIDA, E.; TAKITA, H.; AKASAKA, T.; USHIJIMA, N.; IWANAGA, T.; SUGAYA, T. Antimicrobial photodynamic activity and cytocompatibility of Au<inf>25</inf>(Capt)<inf>18</inf> clusters photoexcited by blue LED light irradiation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2703–2716, 2017.

MÜLLER, A.; PREUSS, A.; RÖDER, B. Photodynamic inactivation of Escherichia coli – Correlation of singlet oxygen kinetics and phototoxicity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 178, n. August 2017, p. 219–227, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.11.017>.

NEMEZIO, M. A.; DE SOUZA FARIAS, S. S.; BORSATTO, M. C.; AIRES, C. P.; CORONA, S. A. M. Effect of methylene blue-induced photodynamic therapy on a Streptococcus mutans biofilm model. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 20, n. October, p. 234–237, 2017.

NEVES, F. C.; CLEMENTE, W. T.; LINCOPAN, N.; PAIÃO, I. D.; NEVES, P. R.; ROMANELLI, R. M.; LIMA, S. S. S.; PAIVA, L. F.; MOURÃO, P. H. O.; NOBRE-JUNIOR, V. A. Clinical and microbiological characteristics of OXA-23- and OXA-143-producing Acinetobacter baumannii in ICU patients at a teaching hospital, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 556–563, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2016.08.004>.

OWLIA, P.; AZIMI, L.; GHOLAMI, A.; ASGHARI, B.; LARI, A. R. resistance in Acinetobacter baumannii : a global threat to burn patients. p. 182–187, 2012.

PATRICK R., M.; KEN S., R.; MICHAEL A., P. **Microbiologia Médica**. 6ª Edição ed. [s.l.] Elsevier, 2014.

PRAZMO, E. J.; KWASNY, M.; LAPINSKI, M.; MIELCZAREK, A. Photodynamic Therapy As a Promising Method Used. **Adv. Clin. Exp. Med.**, v. 25, n. 4, p. 799–807, 2016.

ROYER, S.; LUIZA, A.; FARIA, S.; MIYUKI, L.; PAVONI, T.; CHAGAS, G.; AMARAL, P.; CAMPOS, D.; WILLIAM, D.; DUTRA, M.; GONTIJO, P. P.; MARQUES, R. Spread of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa clones in patients with ventilator-associated pneumonia in an adult intensive care unit at a university hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 350–357, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2015.03.009>.

SAITAWEE, D.; TEERAKAPONG, A.; MORALES, N. P.; JITPRASERTWONG, P.; HORMDEE, D. Photodynamic therapy of Curcuma longa extract stimulated with blue light against Aggregatibacter actinomycetemcomitans. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 2018. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S157210001830019X>.

SANITÁ, P. V.; PAVARINA, A. C.; DOVIGO, L. N.; RIBEIRO, A. P. D.; ANDRADE, M. C.; MIMA, E. G. D. O. Curcumin-mediated anti-microbial photodynamic therapy against Candida dubliniensis biofilms. **Lasers in Medical Science**, p. 1–9, 2017.

SANTEZI, C.; REINA, B. D.; DOVIGO, L. N. Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections-A Review. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 21, n. January, p. 409–415, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29378256>.

SÖKMEN, M.; AKRAM KHAN, M. The antioxidant activity of some curcuminoids and chalcones. **Inflammopharmacology**, v. 24, n. 2–3, p. 81–86, 2016.

SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm

Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**, v. 5594, n. December, p. 223–229, 2015.

SPERANDIO, F. F.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Kill Gram-negative Bacteria. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, v. 8, n. 2, p. 1–23, 2013.

TSAI, W. H.; YU, K. H.; HUANG, Y. C.; LEE, C. I. EGFR-targeted photodynamic therapy by curcumin-encapsulated chitosan/TPP nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 903–916, 2018.

VIJAY, G.; MANDAL, A.; SANKAR, J.; KAPIL, A.; LODHA, R.; KABRA, S. K. Ventilator Associated Pneumonia in Pediatric Intensive Care Unit: Incidence, Risk Factors and Etiological Agents. **Indian Journal of Pediatrics**, p. 5–10, 2018.

VIJAYAKUMAR, S.; RAJENDERAN, S.; LAISHRAM, S.; ANANDAN, S.; BALAJI, V.; BISWAS, I. Biofilm Formation and Motility Depend on the Nature of the Acinetobacter baumannii Clinical Isolates. **Frontiers in Public Health**, v. 4, n. May, p. 105, 2016. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpubh.2016.00105>.

WAINWRIGHT, M.; SMALLEY, H.; SCULLY, O.; LOTFIPOUR, E. Comparative Photodynamic Evaluation of New Phenothiazinium Derivatives against Propionibacterium acnes †. n. 10, p. 523–526, 2012.

YEO, H. J.; YOON, S. H.; LEE, S. E.; CHO, W. H.; KIM, D.; JEON, D.; SHIN, K.-H.; KIM, Y. S. Bacterial Biofilms on Extracorporeal Membrane Oxygenation Catheters. **American society of artificial internal organs**, 2018.

Figuras e legendas

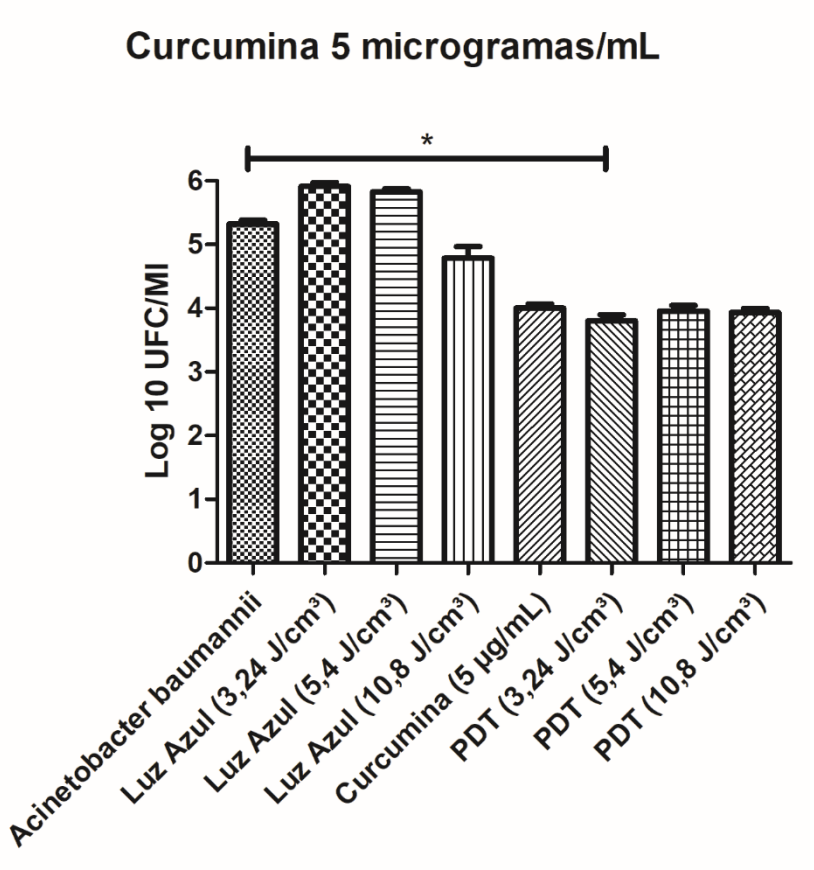

Figura 1- Medias expressas em log 10 UFC/mL e desvio padrão (barras de erro) obtidos com o teste de Kruskall-Wallis e pós-teste de Dunn (5%) para os grupos experimentais tratados com PDT curcumina (5 µg/mL). * = diferença estatística. P valor <0,05=*

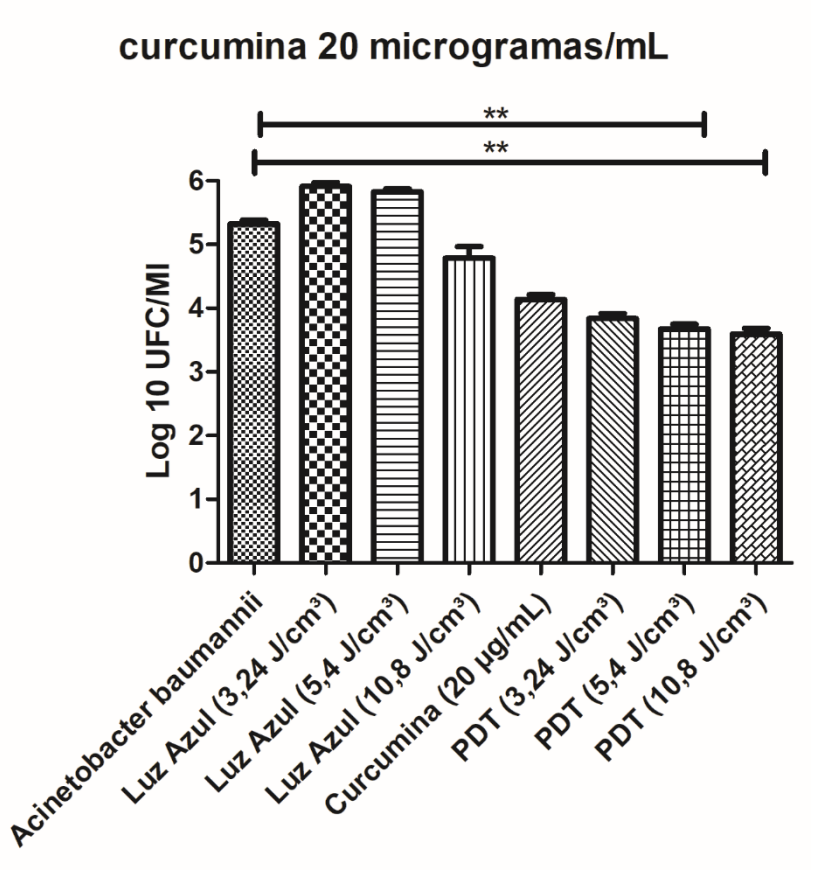

Figura 2- Medias expressas em log 10 UFC/mL e desvio padrão (barras de erro) obtidos com o teste de Kruskall-Wallis e pós-teste de Dunn (5%) para os grupos experimentais tratados com PDT curcumina (20 µg/mL). * = diferença estatística. P valor <0,01=**

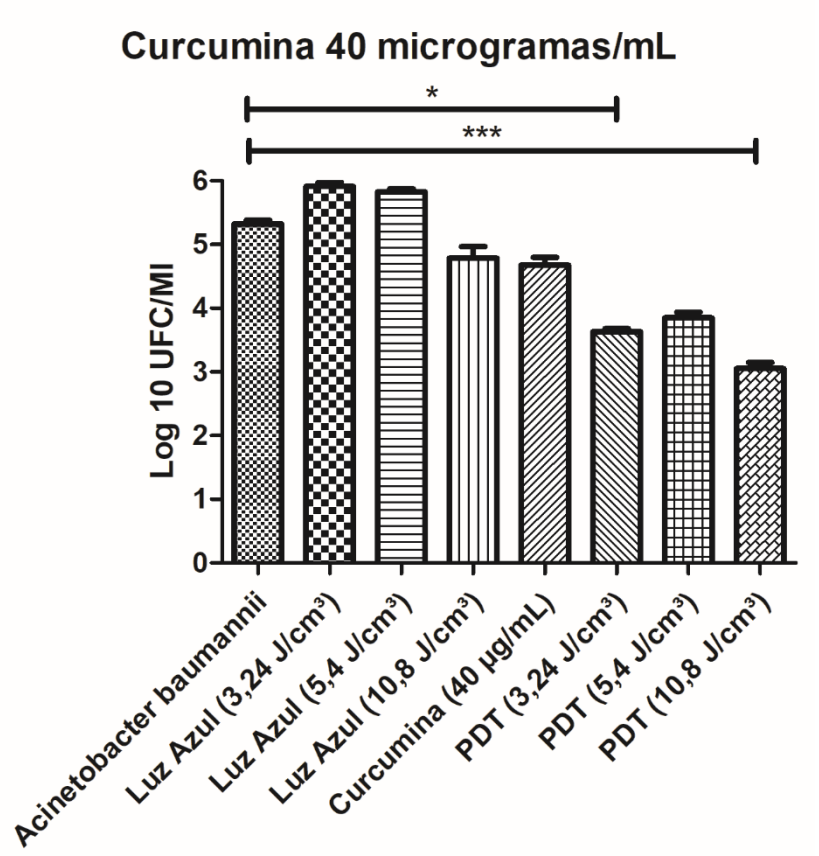

Figura 3- Medias expressas em log 10 UFC/mL e desvio padrão (barras de erro) obtidos com o teste de Kruskall-Wallis e pós-teste de Dunn (5%) para os grupos experimentais tratados com PDT porfirina (40 µg/mL). * = diferença estatística. P valor <0,05=*; P-valor<0,001=***

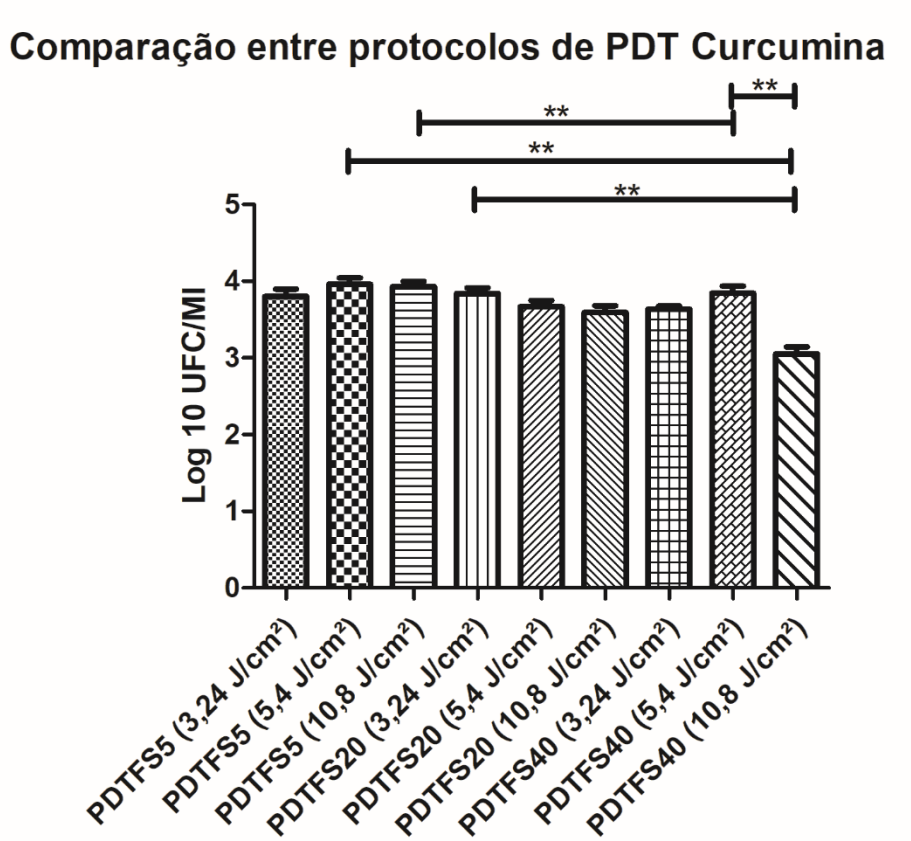

Figura 4- Medias expressas em log de 10 UFC/mL e desvio padrão (barras de erro) obtidos com o uso do teste não-paramétrico de Kruskall-Wallis e pós-teste Dunn (5%) para os grupos experimentais do TFD. *= diferença estatística. P-valor<0,05=* ;P valor <0,01=**.

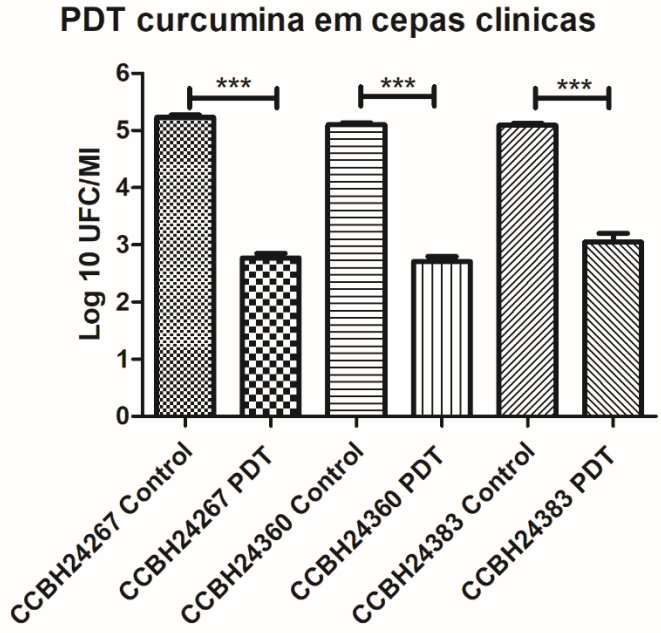

Figura 5- Médias expressas em log de 10 UFC/mL e desvio padrão (barras de erro) obtidas pelo teste de Mann-Whitney (95%) para cepas clínicas de *A. baumannii* (CCBH24267, CCBH24360

E CCBH24383) tratadas com PDT curcumina (40 µg/mL) e dose de 10,8 J/cm². * = diferença estatística. P-valor<0,001=***