

CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
MINIMAMENTE INVASIVA E SIMULAÇÃO NA ÁREA DE SAÚDE**

SUYANE PINTO DE OLIVEIRA BILHAR

**TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA COM COMPLEXO DE
RUTÊNIO EM SUSPENSÕES E BIOFILMES MONOESPÉCIE
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

FORTALEZA

2020

SUYANE PINTO DE OLIVEIRA BILHAR

TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA COM COMPLEXOS DE
RUTÊNIO EM SUSPENSÕES E BIOFILMES MONOESPÉCIE DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Dissertação apresentada ao Centro
Universitário Christus para a
obtenção de grau de Mestre em
Tecnologia Minimamente Invasiva e
Simulação na Área da Saúde.

Orientador: Prof. Dra. Ramille Araújo
Lima

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na
Publicação Centro Universitário
Christus - Unichristus

Gerada automaticamente pelo Sistema de Elaboração de Ficha
Catalográfica do Centro Universitário Christus - Unichristus, com
dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Bilhar, Suyane Pinto de Oliveira.

Terapia fotodinâmica antimicrobiana com complexos de rutênio em
suspensões e biofilmes monoespécies de *Staphylococcus aureus* / Suyane
Pinto de Oliveira Bilhar. - 2020.

48 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Centro Universitário Christus - Unichristus,
Mestrado em Tecnologia Minimamente Invasiva e Simulação na Área de
Saúde, Fortaleza, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Ramille Araújo Lima.

Área de concentração: Simulação em Ensino e Inovação na Área da
Saúde

CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA MINIMAMENTE
INVASIVA E SIMULAÇÃO NA ÁREA DE SAÚDE**

Aluna: Suyane Pinto de Oliveira Bilhar

Orientadora: Profa. Dra. Ramille Araújo Lima

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ramille Araújo Lima

Professora do Curso de Odontologia do Centro Universitário Christus
Orientadora

Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva

Professor do Curso de Odontologia do Centro Universitário Christus
Avaliador Interno

Prof. Dra. Vanara Florêncio Passos

Professora do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará
(UFC)
Avaliador Externo

DATA: 30 de novembro de 2020

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, pois sem Ele essa jornada não seria cumprida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ramille Araújo Lima, pela completa maestria a qual conduziu e lapidou este projeto, exalando sabedoria e conhecimento de forma suprema, inspirando a todos que a rodeiam a crescer profissional e pessoalmente.

A minha mãe, Cilda Ângelo de Oliveira Ramos tutora de todos meus ensinamentos de vida, detentora da magia do altruísmo, que sempre me incentivou a buscar o conhecimento e o aprimoramento continuamente e eternamente.

Ao meu irmão, Romero Pinto de Oliveira Bilhar e minha cunhada, Andreisa Paiva Monteiro Bilhar, por todo apoio incondicional, amor gratuito e companheirismo em todos os momentos.

Aos amigos do mestrado presentes em todos os momentos, em especial, Luiz Anderson Bevilaqua Bandeira, Francisco Kedson Vítor de Sousa, Juliana Cynara Santos Lima e Caroline Franco Machado.

Aos amigos incentivadores, em especial, Thais Gomes Falcão Borges, Maria Moura Santana Chaves, Mariana Marconato Monje e Felipe Tiago de Magalhães Sales.

Ao Centro Universitário Christus, pelo apoio e incentivo na realização de um sonho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” *Arthur Schopenhauer*

RESUMO

Uma das principais bactérias patogênicas para os seres humanos e um importante causador de infecções com alta incidência de morbimortalidade é o *Staphylococcus aureus*. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) é um tratamento que envolve o uso de fotossensibilizador que é ativado quando exposto à luz, gerando assim espécies reativas de oxigênio que, por sua vez, podem causar a morte bacteriana. O objetivo desse estudo foi quantificar os níveis de redução de suspensões e biofilmes *Staphylococcus aureus* obtidos após a realização da TFDA com fotossensibilizador à base de rutênio. Em todos os experimentos, utilizou-se o fotossensibilizador Ru(bpy)(dppz)ANT e uma fonte de Diodo Emissor de Luz (LED) (452 nm; 136 mW). Para o teste em suspensões de *S. aureus* ATCC 25923, o fotossensibilizador foi utilizado nas concentrações 19 µM, 38 µM e 76 µM e densidade de energia de 76,26 J/cm². Após aplicação da terapia, as suspensões foram diluídas, plaqueadas em BHI ágar, e permaneceram em estufa bacteriológica por 24h, 37°C para posterior contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Para os testes em biofilmes de *S. aureus* ATCC 25923, a mesma fonte de luz foi utilizada, mas com densidade de energia de 127,10 J/cm², e fotossensibilizador nas concentrações de 76 µM e 152 µM. Os biofilmes foram formados no fundo de placas de poliestireno de 96 poços, e estes permaneceram sob agitação orbital em estufa bacteriológica por 48h a 37°C. Após este período, o sobrenadante foi removido e os tratamentos foram realizados. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA seguido de pós-teste Tukey (nível de significância 5%). Como resultado, em suspensões, foi observada uma potente ação antimicrobiana da TFDA com o fotossensibilizador na concentração de 76µM; em biofilmes, quando a concentração de 152 µM foi utilizada, a TFDA se mostrou mais efetiva. Concluímos que a TFDA realizada com o fotossensibilizador a base de rutênio Ru (bpy)(dppz)ANT foi efetiva frente a suspensões de *S. aureus* nas concentrações e densidade de energia testada. Entretanto, o efeito da terapia se mostrou limitado quando biofilmes de *S. aureus* foram testados, demonstrando que mais protocolos devem ser averiguados.

PALAVRAS-CHAVES: *Staphylococcus aureus*, Compostos de rutênio, Biofilme, Fotoquimioterapia .

ABSTRACT

One of the main pathogenic bacteria for humans and an important cause of infections with a high incidence of morbidity and mortality is *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial photodynamic therapy (TFDA) is a treatment that involves the use of photosensitizers that are activated when exposed to light, thus generating reactive oxygen species that can cause bacterial death. The objective of this study was to quantify the reduction levels of *S. aureus* suspensions and biofilms after the TFDA treatment with a ruthenium-based photosensitizer. In all experiments, the photosensitizer Ru(bpy)(dppz)ANT and a source of Light Emitting Diode (LED) (452 nm; 136 mW) were used. For the test in suspensions of *S. aureus* ATCC 25923, the photosensitizer was used in concentrations of 19 μM , 38 μM and 76 μM and energy density of 76.26 J / cm^2 . After application of the therapy, the suspensions were diluted, plated on BHI agar, and remained in a bacteriological oven for 24 hours, 37°C for later counting of colony forming units (CFU / mL). For the tests on *S. aureus* ATCC 25923 biofilms, the same light source was used, but with an energy density of 127.10 J/ cm^2 , and photosensitizer in concentrations of 76 μM and 152 μM . Biofilms were formed on the bottom of 96-well polystyrene plates, and these remained under orbital agitation in a bacteriological oven for 48 hours at 37°C. After this period, the supernatant was removed, and treatments were performed. The data were submitted to ANOVA test followed by Tukey post-test (significance level 5%). As a result, in suspensions, a potent antimicrobial action of PDT was observed with the photosensitizer in the concentration of 76 μM ; in biofilms, when the concentration of 152 μM was used, TFDA was more effective. We conclude that the TFDA performed with the photosensitizer based on ruthenium Ru(bpy)(dppz)ANT was effective against suspensions of *S. aureus* in the concentrations and energy density tested. However, the effect of the therapy was limited when *S. aureus* biofilms were tested, demonstrating that more protocols should be investigated.

KEYWORDS: *Staphylococcus aureus*, Ruthenium compounds, Biofilm, Photochemotherapy.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1: Dispositivo diodo emissor de luz (LED) desenvolvido para esta pesquisa. O dispositivo permite a irradiação de uma placa de 96 poços (3 poços por vez).

Figura 2. Modelo esquemático de protocolo de ativação da cepa de *S. aureus* ATCC 25923.

Figura 3. Gráfico da viabilidade de suspensões *S. aureus* (Log UFC/mL) após a aplicação dos tratamentos segundo delineamento experimental. Teste estatístico ANOVA seguido de Tukey. Nível de significância considerado foi 5% ($p < 0,05$). Letras iguais representam grupos estatisticamente iguais.

Figura 4. Gráfico da viabilidade de biofilmes *S. aureus* (Log UFC/mL) após a aplicação dos tratamentos segundo delineamento experimental. Teste estatístico ANOVA seguido de Tukey. Nível de significância considerado foi 5% ($p < 0,05$). Letras iguais representam grupos estatisticamente iguais.

Figura 5. Espectros de emissão dos LEDs utilizados.

Figura 6. Esquema eletrônico das ligações dos componentes eletrônicos ao Arduino.

Figura 7. Placas de interface e de LED, antes e após a confecção.

Figura 8. Sistema mecânico de movimentação dos LEDs nos eixos x e y.

Figura 9. Desenhos esquemáticos para posterior impressão em impressora 3D.

Figura 10. Imagem do dispositivo após impressão. Observa-se o correto encaixe da placa de cultura de células na parte superior do dispositivo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de tensão suportadas, corrente, comprimento de onda e potência luminosa para as diferentes cores de LEDs.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – grau centígrado
ANOVA – Análise de variância
ALT – Ácidos lipoteicóicos
ANT - Antraceno
BHI – Brain Heart Infusion
Bpy – biperidina
cm - centímetro
CHX – Clorexidina
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA - Desoxyribonucleic Acid
Dppz - dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina
J - Joules
LED – Diodos emissores de luz
log – logaritmo
MDR1 – Resistência a múltiplas drogas 1
mL - Mililitro
mm - Milímetro
MRSA - *S. aureus* resistente à *meticilina*
mW - miliwatt
nm - Nanômetro
pH – Potencial Hidrogeniônico
ROS – Espécies reativas de oxigênio
Ru - Rutênio
TFDA – Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
µL - Microlitro
µM – Micromolar
UFC – Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	20
2.1. Geral	20
2.2 Específicos	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Teste em suspensões bacterianas de Staphylococcus aureus	21
3.2 Teste em biofilmes maduros de Staphylococcus aureus	24
3.3 Análise de dados	27
4. RESULTADOS	28
4.1 Teste em suspensões bacterianas de Staphylococcus aureus	28
4.2 Teste em biofilmes maduros de Staphylococcus aureus	29
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	37
APÊNDICE A	44

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é um patógeno oportunista, frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis (SANTOS et al., 2007). Entretanto, podem ser responsáveis por uma variedade de infecções, desde moderadas infecções de pele até as mais graves, com risco de vida, como endocardite, pneumonia necrosante, fibrose cística, artrite séptica e sepse (BECKER, 2014). Em muitos casos, essas infecções se originam de bactérias resistentes a antibióticos encontradas em ambiente hospitalar (CAMPOY et al., 2009).

Existem dois tipos de *S. aureus* encontrados em ambientes hospitalares: permanentes e transitórios. O primeiro pode ser encontrado em profissionais da saúde e no ambiente hospitalar. Este último pode ser encontrado em pacientes infectados e em portadores que estão em contato transitório com o hospital (BULLÉ et al., 2016).

A transmissão pode se dar por contato direto. No ambiente hospitalar, os trabalhadores da área de saúde, ao prestar assistência a pacientes portadores persistentes ou manusear objetos colonizados, podem contaminar suas mãos e subsequentemente transmitir o organismo para outros pacientes. O portador de *S. aureus* exerce papel chave na epidemiologia e na patogênese da infecção, sendo o maior fator de risco para desenvolvimento de infecções hospitalares e adquiridas na comunidade. A maioria das infecções estafilocócicas é proveniente de fonte endógena (CAVALCANTI et al., 2006).

As doenças provocadas pelo *S. aureus* podem ser decorrentes da invasão direta dos tecidos, de bacteremia primária ou, exclusivamente, ser devidas às toxinas que ele produz. Essas infecções podem se localizar em um ou em múltiplos sítios, e, de acordo com a localização e outras características, recebem diferentes designações, como foliculite; sico; carbúnculo; antraz; furúnculos localizados na região cervical posterior; hordéolo; hidradenite; e

impetigo. Além das piogênicas, o *S. aureus* pode causar outras infecções mesmo durante um processo infeccioso ou não. Esses diferentes mecanismos e patologias fazem com que o *S. aureus* possua várias características que, por vezes, não são encontradas em todas as cepas desse Gram-positivo, surgindo, entretanto, à medida que nele são identificadas novas e diferentes propriedades patogênicas (SANTOS et al., 2007). Nos hospitais, o tratamento prolongado com antibióticos de amplo espectro, como a vancomicina, torna difícil o controle destas infecções (ALMEIDA et al, 2007).

Esta bactéria tornou-se cada vez mais resistente aos antibióticos. De fato, a resistência à penicilina atingiu rapidamente 90% das cepas (BABA et al, 2016). A América do Sul apresenta um dos índices mais altos de resistência bacteriana em infecções hospitalares. O Brasil tem demonstrado prevalência de infecções hospitalares por *S. aureus* variando entre 17% a 26% e aproximadamente 70% a 100% são causadas por amostras multirresistentes (CATÃO et. al., 2013). *S. aureus* possui um conjunto de mecanismos de virulência e grande versatilidade de estratégias patogênicas, o que influi no desenvolvimento da resistência a antibióticos e eleva a vulnerabilidade à infecção (ALMEIDA et al. 2007).

Um importante mecanismo de virulência dos microrganismos é a formação de biofilmes. Os biofilmes são comunidades de células microbianas altamente dinâmicas, estruturadas e organizadas; as células estão cobertas e imersas em uma matriz extracelular tridimensional de substâncias poliméricas tais como exopolissacarídeos, proteínas e ácidos nucléicos (FLEMMING et al., 2010). Biofilmes são conjuntos organizados de células bacterianas sésseis protegidas por uma matriz extracelular. No cenário clínico, o *S. aureus* forma biofilmes nas superfícies dos cateteres e dispositivos médicos implantados. *S. aureus* nos biofilmes são resistentes a antibióticos e mecanismos de defesa inatos do hospedeiro, como peptídeos antimicrobianos e fagocitose de neutrófilos. O tratamento nesses casos requer a substituição dos cateteres e implantes infectados por novos e subsequente tratamento com antibióticos

resultando em aumento drástico no custo do tratamento (SURESH, BISWAS, BISWAS, 2018).

A formação do biofilme começa com a fixação inicial das células de *S. aureus* às superfícies do cateter e do biomaterial revestidas com proteínas plasmáticas e hospedeiras e não revestidas, seguido pela formação de agregados bacterianos. A matriz extracelular do *S. aureus* é composto de polissacarídeos, ácidos teicóicos, DNA extracelular e várias proteínas de superfície de *S. aureus*, no entanto a quantidade de componentes individuais presentes dentro dos biofilmes varia entre os diferentes tipos isolados de *S. aureus* (BISWAS, BISWAS, SURESH, 2018).

O biofilme de *S. aureus* pode ser formado em dispositivos médicos de permanência, incluindo válvulas cardíacas artificiais implantadas, cateteres e próteses articulares (MCCONOUGHNEY et al., 2014, RIBEIRO et al., 2012). Alguns estudos sugerem que os biofilmes amadurecem em espessas camadas de células, e nesse momento, mecanismos de descolamento são acionados e subpopulações do biofilme são dispersas, formando microcolônias na biomassa remanescente (YARWOOD et al., 2004, PERIASAMY et al., 2012, BOLES e HORSWILLI, 2008).

Diversas estratégias terapêuticas são usadas para combater a infecção por biofilmes de *S. aureus*, incluindo remoção mecânica desse biofilme, tratamento com antibióticos, tratamentos sem antibióticos, imunoterapia, vacinas terapêuticas e, ocasionalmente, combinações dessas opções (PRAPHA KAR et al., 2016).

O uso generalizado de antibióticos resultou em um problema crescente de resistência antimicrobiana em ambientes comunitários e hospitalares. As classes antimicrobianas para as quais a resistência se tornou um problema preocupante incluem os β -lactâmicos, os glicopeptídeos e as fluoroquinolonas (RICE et al., 2012). Para manter o ritmo da resistência aos antibióticos, novos antibióticos, incluindo vancomicina, linezolida, tedizolida, daptomicina,

ceftarolina e tigeciclina, foram desenvolvidos e introduzidos nos últimos anos (MOUSAVI et al., 2016). No entanto, o surto de várias cepas de *S. aureus* multirresistentes a vários níveis mundialmente a uma taxa alarmante resultou em dificuldades de tratamento (DIRISALA, REDDY, SRIRAMA, 2017).

O surgimento de cepas resistentes a antibióticos, além dos efeitos colaterais de alguns destes, incentivaram a busca por novas terapias para prevenção e controle da formação do biofilme (MOHAMMED et al., 2018).

Neste sentido, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) surge como um tratamento alternativo ao uso de agentes antimicrobianos tradicionais. Esta terapia é caracterizada pela associação de um agente fotossensibilizador com uma luz de comprimento de onda complementar, que acarretará na produção de espécies reativas de oxigênio, que são deletérias para as bactérias (WAINWRIGHT, 1998; MAISCH et al., 2007).

Durante esse processo, componentes celulares fotossensíveis passam para um estado excitado quando expostos a uma luz de comprimento de onda complementar que é caracterizado pela passagem dos elétrons para níveis de energia superiores. Neste estado excitado, o fotossensibilizador pode interagir com o oxigênio molecular iniciando a formação de oxigênio singleto altamente reativo (fotoprocesso Tipo II) ou interagir com outras moléculas como aceptores de elétrons resultando na produção de hidroxilas e outros radicais orgânicos (fotoprocesso do Tipo I) (DOUGHERTY et al., 1998; HUANG et al., 2010). Os produtos dessas reações fotoquímicas podem então danificar componentes essenciais das células ou alterar as atividades metabólicas de maneira irreversível resultando na morte bacteriana (MAISCH et al., 2007).

Como a maioria das espécies bacterianas não apresenta componentes fotossensíveis, a utilização de um agente cromóforo que atraia para si a luz e inicie a formação de radicais livres é importante para a efetividade da TFDA. No que diz respeito à interação entre fotossensibilizador e bactéria, a efetividade da terapia está relacionada a três principais aspectos: (1) capacidade do

fotossensibilizador em interagir com a membrana bacteriana; (2) capacidade do fotossensibilizador em penetrar e agir dentro da célula; e (3) formação de oxigênio singlete ao redor da célula bacteriana (NAGATA et al., 2012). Assim, células desprovidas de componentes fotossensíveis endógenos podem se tornar sensíveis à luz se forem coradas com fotossensibilizadores exógenos como derivados das porfirinas, azul de orto-toluidina ou compostos de cloro conjugado (BUCHALLA et al., 2018).

A capacidade de um componente para absorver uma luz incidente não significa necessariamente que o mesmo pode funcionar como um fotossensibilizador. Um fotossensibilizador ideal deve ser não tóxico, deve exibir toxicidade local apenas após ativação por iluminação. Além disso, o fotossensibilizador deve ser um composto puro, com uma composição constante e estável, idealmente ser solúvel em água, capaz de gerar singlete de oxigênio, e estar disponível comercialmente (PLAETZER et al., 2009; LAN et al., 2019).

Em relação aos efeitos citotóxicos dos fotossensibilizadores às células humanas, como queratinócitos e fibroblastos, estudos *in vitro* mostram que esses efeitos são dose dependentes e que a morte de microorganismos ocorre com doses bem menores as que afetam as células (SOUKOS et al., 1996; GOMES-FILHO et al., 2016).

Embora a maioria dos fotossensibilizadores aprovados para uso na TFDA a sejam moléculas orgânicas, complexos inorgânicos baseados em metais também são excelentes, alguns dos quais podem gerar oxigênio singlete reativo (1O_2) em mais altos rendimentos quânticos que complexos orgânicos (LAN et al., 2019).

Entre os compostos baseados em metais atualmente investigados, os Complexos de Rutênio mantêm um futuro promissor, pois esses compostos exibem diferentes estados de oxidação e menor toxicidade em comparação com outros fármacos baseados em metais (GROZAV et al., 2016). Quando

fotoativado a excitação do metal leva à formação de espécies reativas de oxigênio (DAVIA et al., 2008). Além disso, o Rutênio forma várias dimensões estruturais quando combinado com outros compostos, e esses compostos combinados exibem vários modos de ação, tais como interação com DNA, ativação de mecanismos de dano ao DNA e inibição das atividades de várias enzimas (VIDIMAR et al., 2012), a exemplo das enzimas ribonucleotídeo redutase, topoisomerase II, e da inibição da MDR1 (CARVALHO, 2017), bem como permitem o desenho de compostos com um alvo celular específico (MARI et al., 2015).

Com relação à fonte de luz utilizada, a grande maioria dos estudos sobre o efeito antimicrobiano da TFDA utiliza lasers de baixa potência com diversos meios ativos e comprimentos de onda (BUCHALLA et al., 2018). O uso de dispositivos semicondutores que quando polarizados adequadamente emitem luz na faixa visível ou invisível, os chamados diodos emissores de luz (LED) surgiram como luzes alternativas a essa terapia (ZANIN et al., 2005; ZANIN et al., 2006). Embora tanto os lasers quanto os LED produzam luzes monocromáticas, os LED apresentam colimação e coerência menos eficientes, resultando em bandas de emissão mais largas que acabam por favorecer a obtenção de efeito antimicrobiano, uma vez que a luz é emitida em todo o espectro de absorção dos fotossensibilizadores durante a realização da terapia fotodinâmica (KIM, DARAFSHEH, 2020).

A TFDA apresenta várias vantagens quando comparado às terapias antimicrobianas tradicionais, incluindo, a capacidade de matar uma grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias, leveduras, fungos e protozoários, bem como inativar vírus; a baixa chance de desenvolver espécies fotossensíveis mesmo após múltiplos tratamentos; a capacidade de conceber a terapia de uma forma que possa apresentar seletividade para microrganismos sobre as células hospedeiras e o tecido; o baixo risco de induzir mutações; e o pouco tempo necessário para matar as células microbianas (minutos), enquanto os antibióticos tradicionais podem levar dias (MAISCH, 2015; CIEPLIEK et

al.,2018). Como os fotossensibilizadores são administrados por via tópica, podem ser eficazes quando o suprimento de sangue é comprometido. Além disso, a TFDA pode ser eficaz contra biofilmes, que são geralmente mais resistentes aos antibióticos (ARAGÃO et al., 2017).

Em se tratando de infecções causadas por *S. aureus*, a TFDA apresenta uma grande vantagem em relação ao uso de antimicrobianos tradicionais, que é a baixa probabilidade de desenvolvimento de cepas resistentes (MAISCH, 2015). Além disso, a TFDA foi efetiva contra micro-organismos antibiótico-resistentes, e repetidas aplicações não resultam em “seleção bacteriana” (EICHNER et al., 2014; QIAN-XIONG et al., 2019).

A utilização da TFDA frente à *S. aureus* tem mostrado resultados promissores (SURESH, BISWAS, BISWAS, 2018). Entretanto, estudos com complexos de rutênio frente a biofilmes de *S. aureus* ainda são limitados (GU et al., 2015; CHOPRA et al., 2019). Logo, existe a necessidade de investigações adicionais sobre a ação deste fotossensibilizador na TFDA.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Analisar a ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica com complexo de rutênio frente à *Staphylococcus aureus*.

2.2. ESPECÍFICOS

- Quantificar os níveis de redução de suspensões de *Staphylococcus aureus* obtidos após a realização da terapia fotodinâmica antimicrobiana com fotossensibilizador à base de rutênio Ru(bpy)(dppz)ANT nas concentrações de 19 μM , 38 μM e 76 μM .
- Quantificar os níveis de redução de biofilmes de *Staphylococcus aureus* obtidos após a realização da terapia fotodinâmica antimicrobiana com fotossensibilizador à base de rutênio Ru(bpy)(dppz)ANT nas concentrações de 76 μM e 152 μM .

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Teste em suspensões bacterianas de *Staphylococcus aureus*

Fotossensibilizador e Fonte de luz

O fotossensibilizador utilizado foi o Ru(bpy)(dppz)ANT, massa molar 1218,9 g/mol, nas concentrações 19 μM , 38 μM e 76 μM , estocado em frasco âmbar ao abrigo da luz em temperatura ambiente. O composto foi desenvolvido pelo Programa de Pós-Graduação em Química Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (ABREU et al. 2017). O fotossensibilizador foi solubilizado em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 5%. Após solubilização e diluição, o fotossensibilizador apresenta cor amarela.

A fonte de luz utilizada foi um Diodo Emissor de Luz (LED) com comprimento de onda predominante de 452 nm (luz azul). A fonte de luz utilizada nesse estudo foi fabricada para o presente experimento científico (Figura 1). A descrição técnica do dispositivo encontra-se detalhada no apêndice A. A potência de saída da luz, confirmada através de aparelho potenciômetro (Power meter, ThorLabs GmbH, Dachau, Alemanha) foi de 136 mW. A densidade de energia utilizada será de 76,26 J/cm².

Para calcular a densidade de energia é utilizada a fórmula: $DE = (P \times t)/A$, aonde a potência (P) é calculada em Watts, o tempo (t) em segundos e a área (A) em cm². O local irradiado foi o poço de uma placa de cultura de células de 96 poços, cuja área é 0,321 cm². O tempo de irradiação utilizado foi de 3 minutos e a distância entre a fonte de luz e o local da irradiação foi 3 mm. O tempo de pré-irradiação foi de 5 minutos.



Figura 1: Dispositivo diodo emissor de luz (LED) desenvolvido para esta pesquisa. O dispositivo permite a irradiação de uma placa de 96 poços (3 poços por vez).

Fonte: Próprio autor.

Preparo do inóculo S. aureus

O microrganismo utilizado foi o *S. aureus* ATCC 25923. Para realização desse experimento, inicialmente, foram retirados 200 μ l da cepa congelada em meio de cultura BHI-glicerol (*Brain Heart Infusion*) (Difco Detroit, Michigan, USA) e transferidos para tubos contendo meio de cultura BHI suplementado com glicose (concentração final de glicose 1%). Os tubos foram armazenados em estufa bacteriológica a 37° C por 24 horas. Após 24 horas, foi realizado o estriamento por esgotamento desse caldo em placas de BHI ágar-sangue (Difco Detroit, Michigan, USA) e a placa foi armazenada por 24 horas em estufa bacteriológica a 37°C. Assim, foi obtida a placa estoque, que será utilizada para realização das 3 repetições desse experimento (triplicata) (Figura 2).

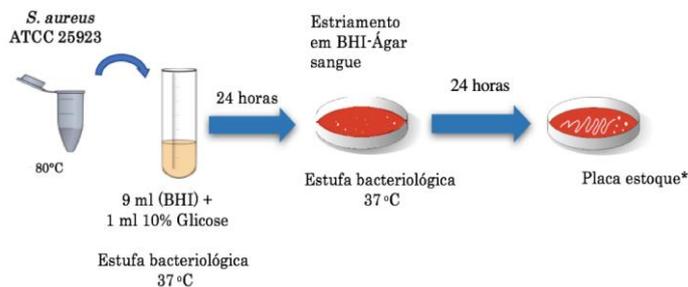


Figura 2. Modelo esquemático de protocolo de ativação da cepa de *S. aureus* ATCC 25923. * Placa estoque com validade de 1 mês. Passado esse período, uma nova placa era preparada.

Fonte: Próprio autor.

Da placa estoque, foram retiradas 5 unidades formadoras de colônia (UFC) e estas transferidas para um tubo contendo BHI caldo suplementado com glicose a 1%. A suspensão permaneceu em estufa bacteriológica por um período de 24 horas, em temperatura de 37°C e, após esse período, o inóculo foi ajustado através de espectrofotômetro afim de se obter uma suspensão com 2×10^8 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml).

Delineamento experimental

Os grupos experimentais delineados, assim como o protocolo utilizado, encontram-se descritos abaixo:

- 1) Controle Negativo (DMSO 5%): 100 μ L da suspensão bacteriana + 100 μ L de DMSO 5%;
- 2) Só Luz (DMSO 5% + LUZ AZUL): 100 μ L da suspensão bacteriana + 100 μ L de água destilada + Luz 3 minutos;
- 3) Só Fotossensibilizador 19 μ M (FOTO 19 μ M): 100 μ L da suspensão bacteriana + 100 μ L do fotossensibilizador na concentração 19 μ M;
- 4) Terapia Fotodinâmica 19 μ M (FOTO 19 μ M + LUZ): 100 μ L da suspensão bacteriana + 100 μ L do fotossensibilizador na concentração 19 μ M + Luz 3 minutos.

- 5) Só Fotossensibilizador 38 μM (FOTO 38 μM): 100 μL da suspensão bacteriana + 100 μL do fotossensibilizador na concentração 38 μM ;
- 6) Terapia Fotodinâmica 38 μM (FOTO 38 μM + LUZ): 100 μL da suspensão bacteriana + 100 μL do fotossensibilizador na concentração 38 μM + Luz 3 minutos
- 7) Só Fotossensibilizador 76 μM (FOTO 76 μM): 100 μL da suspensão bacteriana + 100 μL do fotossensibilizador na concentração 76 μM ;
- 8) Terapia Fotodinâmica 76 μM (FOTO 76 μM + LUZ): 100 μL da suspensão bacteriana + 100 μL do fotossensibilizador na concentração 76 μM + Luz 3 minutos;
- 9) Controle Positivo (CHX): 100 μL da suspensão bacteriana + 100 μL de Digluconato de Clorexidina 0,12% (Periotrat sem álcool, Kley Hertz Farmacêutica) que ficou em contato com a solução por 1 minuto.

Ressalta-se que, durante o período de pré-irradiação, as placas permaneciam protegidas da luz.

Imediatamente após a aplicação do tratamento, de acordo com o grupo experimental, o volume total (200 μL) foi transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 ml e em seguida as diluições decimais seriadas foram realizadas. Em seguida, as diluições foram plaqueadas em placas de petri contendo meio de cultura BHI ágar e incubadas em condições ideais para o crescimento desse microrganismo (estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas). Após este período, as colônias foram contadas e a relação de UFC/ml será estabelecida. O estudo foi conduzido em 3 momentos experimentos diferentes (triplicata), com 3 amostras por grupo, por repetição.

3.2 Teste em biofilmes maduros de *Staphylococcus aureus*

Fotossensibilizador e Fonte de luz

O fotossensibilizador utilizado foi o mesmo descrito no item 3.1, nas concentrações 76 μM e 152 μM , estocado em frasco âmbar ao abrigo da luz

em temperatura ambiente. A fonte de luz utilizada foi o mesmo Diodo Emissor de Luz (LED) utilizado no experimento anterior.

O local irradiado foi o fundo do poço de uma placa de cultura de células de 96 poços de fundo chato, cuja área é 0,321 cm². O tempo de irradiação utilizado foi 5 minutos e a distância entre a fonte de luz e o local da irradiação foi de 3 mm. O tempo de pré-irradiação foi de 5 minutos. A densidade de energia foi 127,10 J/cm².

Preparo do inóculo

Staphylococcus aureus, cepa ATCC 25923, foi utilizado como inóculo a fim de proporcionar formação de biofilme. O inóculo foi preparado conforme descrito no item 3.1.

Ativação e ajuste da concentração do inóculo

Da placa estoque, foram retiradas 5 unidades formadoras de colônia (UFC) e estas transferidas para um tubo contendo 10 mL de BHI glicosado (glicose concentração final 1%). Os tubos permaneceram por 24h em estufa bacteriológica. Após este período, os tubos foram retirados da estufa e foi realizado o ajuste da concentração da cepa para a escala 5 Mac Farland, que corresponde a concentração de 15×10^8 UFC/mL (protocolo adaptado de SIDRIM et al., 2016).

Formação do biofilme

Os biofilmes foram formados no fundo de placas de cultura de células de 96 poços de fundo chato.

Para a formação do biofilme, 175 µl de caldo BHI glicosado (concentração final de glicose 1%) foi distribuído em cada poço de uma placa de cultura de células de 96 poços) e em seguida foi adicionado a cada poço 25 µl da suspensão previamente ajustada, dessa forma, a concentração final de

microrganismos foi $1-2 \times 10^8$ UFC/mL (protocolo adaptado de SIDRIM et al., 2016).

A placa contendo o biofilme permaneceu sob agitação orbital em estufa bacteriológica por 48h, 37°C. Após estas 48h, a placa foi removida da estufa e os tratamentos foram realizados, conforme descrito a seguir.

Delineamento experimental

Após 48 horas da formação inicial do biofilme, as placas foram retiradas da estufa. A suspensão, e biofilme fracamente aderido, foram removidos (100 µL) e foi dado início aos tratamentos, segundo o grupo experimental descrito abaixo:

Os seguintes grupos foram realizados: 1) Controle Negativo (DMSO 5%); 2) Só Luz (DMSO 5% + LUZ AZUL); 3) Só Fotossensibilizador 76 µM (FOTO 76 µM); 4) Terapia Fotodinâmica 76 µM (FOTO 76 µM + LUZ); 5) Só Fotossensibilizador 152 µM (FOTO 152 µM); 6) Terapia Fotodinâmica 152 µM (FOTO 152 µM + LUZ); 7) Controle Positivo, Digluconato de Clorexidina 0,12 % (CHX).

1) Controle Negativo (DMSO 5%): foram adicionados 100 µL da solução DMSO 5% por 5 minutos e em seguida o biofilme permaneceu por 5 minutos no escuro (protegidos da luz).

2) Só Luz (DMSO 5% + LUZ AZUL): foram adicionados 100 µL da solução DMSO 5% por 5 minutos e em seguida o biofilme foi exposto à luz azul por 5 minutos.

3) Só Fotossensibilizador 76 µM (FOTO 76 µM): foram adicionados 100 µL do fotossensibilizador, na concentração 76 µM, por 5 minutos e em seguida o biofilme permaneceu por 5 minutos no escuro (protegidos da luz).

4) Terapia Fotodinâmica 76 µM (FOTO 76 µM + LUZ): foram adicionados 100 µL do fotossensibilizador, na concentração 76 µM, por 5 minutos e em seguida o biofilme foi exposto à luz azul por 5 minutos.

5) Só Fotossensibilizador 152 μM (FOTO 152 μM): foram adicionados 100 μl do fotossensibilizador, na concentração 152 μM , por 5 minutos e em seguida o biofilme permaneceu por 5 minutos no escuro (protegidos da luz).

6) Terapia Fotodinâmica 152 μM (FOTO 152 μM + LUZ): foram adicionados 100 μl do fotossensibilizador, na concentração 152 μM , por 5 minutos e em seguida o biofilme foi exposto à luz azul por 5 minutos.

7) Controle Positivo, Digluconato de Clorexidina 0,12 % (CHX): foram adicionados 100 μl da solução de digluconato de clorexidina 0,12% (Periotrat sem álcool, Kley Hertz Farmacêutica, Porto Alegre, Brasil) por 1 minuto.

Coleta do biofilme

Para coleta do biofilme formado no fundo da placa, após realização dos experimentos descritos acima, esse biofilme foi suspenso por pipetagem e transferido para tubos eppendorfs. Os tubos foram agitados e em seguida foram diluídos de forma seriada até 10^{-5} . Após diluição, as amostras foram plaqueadas em BHI ágar (Difco Detroit, Michigan, USA) e as placas permaneceram por 24 h em estufa bacteriológica a 37°C para posterior contagem das unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

3.3 Análise dos dados

Os resultados foram transformados para logaritmo na base dez e calculadas as médias e desvios-padrões de cada grupo. Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, e então realizado o teste ANOVA seguido de pós-teste Tukey. Foi considerado o nível de significância de 5% e intervalo de confiança de 95%. O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism 5.0®.

4. RESULTADOS

4.1 Teste em suspensões bacterianas de *Staphylococcus aureus*

Os resultados da aplicação da Terapia Fotodinâmica com complexo a base de rutênio em suspensões de *S. aureus* estão mostrados na figura 3.

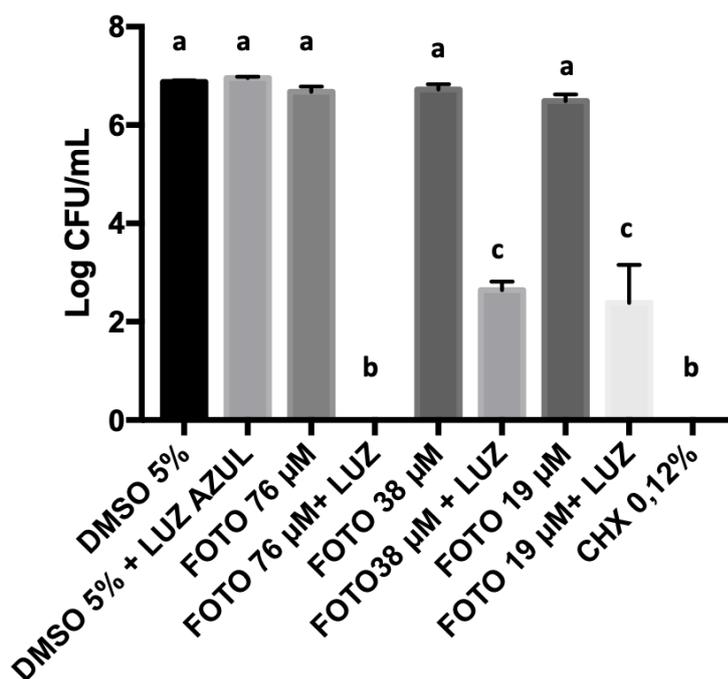


Figura 3. Gráfico da viabilidade de suspensões *S. aureus* (Log UFC/mL) após a aplicação dos tratamentos segundo delineamento experimental. Teste estatístico ANOVA seguido de Tukey. Nível de significância considerado foi 5% ($p < 0,05$). Letras iguais representam grupos estatisticamente iguais.

Foi observada uma potente ação antimicrobiana, semelhante à clorexidina (controle positivo) (CHX 0,12%), quando a terapia fotodinâmica foi aplicada, utilizando o fotossensibilizador na concentração 76 µM (FOTO 76 µM + LUZ). Não foram observadas unidades formadoras de colônias nesses grupos. Não foi observada redução significativa quando os

fotossensibilizadores, nas diversas concentrações, foram utilizados na ausência de luz. Os grupos FOTO 76 μM ($6,67 \pm 0,11$), FOTO 38 μM ($6,72 \pm 0,10$) e FOTO 19 μM ($6,48 \pm 0,13$) tiveram contagem de microrganismos semelhante ao controle negativo (DMSO 5%) ($6,87 \pm 0,03$) ($p > 0,05$). Somente a aplicação da luz, na ausência de fotossensibilizador, também não demonstrou efeito antimicrobiano ($6,95 \pm 0,02$), tendo resultado semelhante ao controle negativo ($p > 0,05$). Os grupos que realizaram terapia fotodinâmica (Fotossensibilizador + Luz), nas concentrações de 38 μM ($2,64 \pm 0,17$) e 19 μM ($2,38 \pm 0,76$), obtiveram uma redução significativa das UFC/mL, redução esta superior a 4 logs, quando comparado ao controle negativo ($p < 0,05$). Entretanto, esta redução não foi superior a obtida pelo grupo FOTO 76 μM + LUZ ($p < 0,05$). Ambos os grupos (FOTO 38 μM + LUZ e FOTO 19 μM + LUZ) foram semelhantes estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

4.2 Teste em biofilmes maduros de *Staphylococcus aureus*

Os resultados da aplicação da Terapia Fotodinâmica com complexo a base de rutênio em biofilmes de *S. aureus* estão mostrados na figura 4.

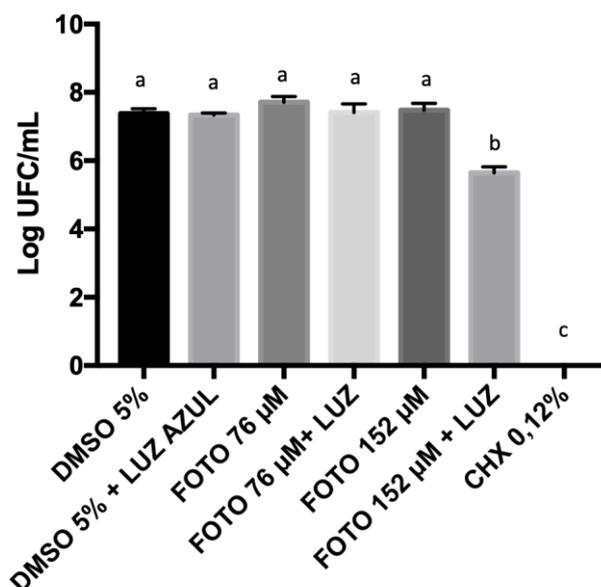


Figura 4. Gráfico da viabilidade de biofilmes *S. aureus* (Log UFC/mL) após a

aplicação dos tratamentos segundo delineamento experimental. Teste estatístico ANOVA seguido de Tukey. Nível de significância considerado foi 5% ($p < 0,05$). Letras iguais representam grupos estatisticamente iguais.

Não foi observada diferença significativa na contagem de unidades formadoras de colônia entre o grupo controle negativo (DMSO 5%) ($7,38 \pm 0,14$) e os seguintes grupos: DMSO 5% + LUZ ($7,33 \pm 0,05$), FOTO 76 μM ($7,70 \pm 0,16$), FOTO 76 μM + LUZ ($7,41 \pm 0,24$), FOTO 152 μM ($7,47 \pm 0,20$) ($p > 0,05$). Não foi observada uma superioridade da terapia fotodinâmica quando a concentração de 76 μM foi testada. Entretanto, quando o fotossensibilizador na concentração de 152 μM foi utilizado, a terapia fotodinâmica se mostrou mais efetiva (FOTO 152 μM + LUZ) ($5,62 \pm 0,17$), e uma diferença significativa foi observada na comparação deste grupo como o seu semelhante, na ausência de luz (FOTO 152 μM) ($7,47 \pm 0,20$) ($p < 0,05$). Da mesma forma, também foi observada uma redução estatisticamente significativa na comparação do grupo (FOTO 152 μM + LUZ) ao grupo controle negativo, com uma redução de $\pm 1,7$ logs ($p < 0,05$). O grupo controle positivo (CHX 0,12%) mostrou níveis indetectáveis de unidades formadoras de colônia.

5. DISCUSSÃO

Staphylococcus aureus é uma das principais bactérias patogênicas para os seres humanos e um importante causador de infecções com alta incidência de morbimortalidade, sendo este microorganismo um agente frequente de infecções em recém-nascidos, crianças e adultos, causando infecções da pele e dos tecidos moles, pneumonia, meningite, septicemia e outras infecções a nível comunitário e hospitalar (BULLÉ et al., 2016).

A resistência à penicilina surgiu em meados da década de 1940, apenas alguns anos após a introdução desse antibiótico na prática clínica. Posteriormente, em 1959, o antibiótico semi-sintético *meticilina* foi introduzido para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus* resistente à penicilina. No entanto, em 1961, foram relatados os primeiros casos isolados de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e atualmente, apenas poucos compostos ainda são eficazes no tratamento de infecções por MRSA (BARTOLOMEU et al., 2016).

De acordo com o Fórum Econômico Mundial, o mundo está oscilando na era "pós-antibiótica", onde se acredita que os gastos com saúde aumentarão para US \$ 100 trilhões até 2050 e que cerca de 700.000 mortes ocorrem todos os anos por infecções por bactérias resistentes. Assim, encontrar novas terapias para controlar infecções causadas por bactérias multirresistentes tornou-se cada vez mais importante (FREITAS et al., 2019).

Sendo assim, considerando-se a importância médica do microorganismo *S. aureus*, e a virulência dos biofilmes, este foi o microorganismo de escolha neste estudo.

A terapia fotodinâmica vem sendo bastante estudada e a literatura mostra os seus efeitos como antimicrobiano (FREITAS et al, 2017; AL-AHMED et al, 2018). Porém, para a realização de uma terapia fotodinâmica efetiva, são necessários três elementos básicos: um agente fotossensibilizante, uma fonte

de luz de comprimento de onda específico para ativar o agente de fotossensibilização e oxigênio molecular, que é essencial para a formação de espécies reativas de oxigênio (ISSA et al., 2010).

Atualmente, a miniaturização de dispositivos de luz, como lasers de baixa potência, diodos emissores de luz ou lâmpadas convencionais capazes de ativar as moléculas antimicrobianas, coloca essa tecnologia mais próxima do uso em aplicações clínicas (AHMED et al, 2018). Os diodos emissores de luz (LED) tem se mostrado uma boa alternativa como fonte de luz na terapia fotodinâmica e apresentam diversas vantagens por serem relativamente baratos, estáveis, fáceis de operar e requererem pouca manutenção (JUZENIENE et al., 2004).

A criação de um dispositivo de luz para utilização neste estudo se deu devido a necessidade de um equipamento que permitisse uma irradiação de forma mais rápida de inúmeros poços, e que não exigisse que a placa de 96 poços permanecesse aberta durante a irradiação, o que aumentaria a probabilidade de contaminação.

Novos métodos de erradicação de bactérias são necessários como alternativas aos tratamentos com antibióticos, a crescente emergência de resistência antimicrobiana levou a grandes esforços científicos para descobrir tratamentos alternativos, como a Terapia Fotodinâmica Antimicrobianos. A Terapia Fotodinâmica se mostrou efetiva frente a cepas de *S. aureus* meticilina-resistente (ARENAS et al., 2013), e sem desenvolvimento de um novo mecanismo de resistência, quando a mesma foi utilizada repetitivamente em culturas de *S. aureus* (AHMED et al., 2018).

O desenvolvimento de modalidades alternativas de tratamento antimicrobiano vem com o desenvolvimento de novas classes de fotossensibilizadores, como os complexos metálicos. Entre eles, os complexos de Rutênio (II), incluindo os complexos de polipiridil Ru (II), são uma grande

promessa para inativar e erradicar microorganismos patogênicos, incluindo bactérias, fungos e vírus (GASSER et al, 2020).

Os complexos de rutênio são fotosensibilizadores promissores, devido a sua capacidade de gerar oxigênio singleto (DAVIA et al., 2008) e causar danos ao DNA de células bacterianas (CZERWONKA et al., 2019; POON et al., 2010; VIDIMAR et al., 2012), bem como permitem o desenho de compostos com um alvo celular específico (MARI et al., 2015; ABREU et al. 2017).

A atividade antimicrobiana frente à *S. aureus* do complexo de rutênio aqui testado, Ru (bpy)(dppz)ANT, já foi verificada anteriormente por Abreu e colaboradores (2017). Os autores encontraram a concentração de 6,7 μM como inibitória (MIC) e bactericida mínima (MBC). Ressalta-se a diferença metodológica do presente estudo, com o estudo aqui citado: Nos estudos de MIC e MBC, a concentração do inóculo é menor (10^6 UFC/mL), e a droga permanece em contato com o inóculo por um tempo bem maior (24 horas). No presente estudo, a concentração do inóculo utilizada foi de 10^8 UFC/mL e o efeito antimicrobiano foi analisado imediatamente após a realização da terapia.

Alguns estudos confirmam a atividade antibacteriana dos complexos de rutênio contra biofilmes de diferentes bactérias. Srivastava e colaboradores (2019) utilizaram o complexo $[\text{Ru}(\text{NN})_2(\text{cur})](\text{PF}_6)$, reduzindo a atividade bacteriana do microrganismo *S. aureus*, observando ação antibacteriana significativamente mais potente na redução de biofilmes pré-formados quando comparado com a vancomicina e a levofloxacina. Já o estudo de Czerwonka e colaboradores (2019) utilizou complexo de rutênio à base de benzimidazol, observando que ele afetou a colonização por *Pseudomonas aeruginosa* e a formação de biofilme.

O trabalho de Wang et al (2015) utilizou a terapia com rutênio para avaliar a resistência do *S. aureus* tanto em suspensão como em biofilme e ele verificou que o biofilme era menos sensível a terapia fotodinâmica quando comparado as culturas planctônicas. Esse achado também observado em

nosso estudo, aonde a terapia fotodinâmica foi bastante efetiva quando o fotossensibilizador foi utilizado na concentração de 78 μM em suspensões de *S. aureus*, e foi apenas parcialmente efetiva quando a concentração de 152 μM foi testada em biofilmes. A escolha, neste estudo, em testar concentrações maiores, e maiores densidades de energia nos testes em biofilme está de acordo com a literatura, pois bactérias em biofilmes são menos susceptíveis a terapia fotodinâmica do que bactérias em suspensão (FONTANA et al., 2009).

Papastamou et al. (2011) investigaram os efeitos da TFDA com três fotossensibilizadores a base de rutênio em suspensões de *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* e verificaram que tris-[(1,10-phenanthroline-4,7-diyl)-bis-(benzenesulfonato)]-ruthenate tetra-anion (RSD3) e tris-(2,20-bipyridine)-ruthenium(II) dication (RBY) não apresentaram efeitos antibacterianos relevantes, já tris-(4,7-diphenyl 1,10-phenanthroline)-ruthenium(II)-dication (RD3) conseguiu uma inibição bacteriana considerável. Segundo eles, um dos fatores que pode influenciar no sucesso da TFDA com rutênio é a capacidade de ligação dos fotossensibilizadores as estruturas celulares. Além do mais, a extensão da geração de oxigênio singlete desempenha um papel crucial em relação à estabilidade, integridade e metabolismo da célula bacteriana. Esses fatores podem explicar os resultados obtidos em nosso trabalho com o complexo de rutênio Ru (bpy)(dppz)ANT.

Frei et al. (2014) investigaram os efeitos da TFDA com dois compostos de rutênio Rutênio, Ru(DIP)₂(bdt) (1) e [Ru(dqpCO₂Me)(ptpy)]²⁺ (2) em suspensões de *S. aureus* (Gram positiva) e *Escherichia coli* (Gram negativa). Verificaram que com os dois fotossensibilizadores obteve-se uma redução de 6log₁₀ na viabilidade celular em concentrações de 50 μM contra a cepa *S. aureus*. O composto 1 não mostrou efeito contra a cepa *Escherichia coli*, enquanto o composto 2 reduziu a viabilidade celular em 4log₁₀ a 50 μM . Foi um resultado interessante porque as cepas Gram negativas são conhecidas por serem menos sensíveis. Em nosso estudo, utilizamos um diferente composto, também à base de rutênio, e obtivemos uma redução à níveis indetectáveis de

colônias de *S. aureus* quando a concentração de 76 μM foi utilizada, e uma redução superior a 4-logs quando as concentrações de 38 μM e 19 μM foram testadas, em suspensões.

6. CONCLUSÃO

Concluimos que a terapia fotodinâmica antimicrobiana realizada com o fotossensibilizador a base de rutênio Ru (bpy)(dppz)ANT foi efetiva frente a suspensões de *S. aureus* nas concentrações e densidade de energia testada. Entretanto, o efeito da terapia se mostrou limitado quando biofilmes de *S. aureus* foram testados, demonstrando que mais protocolos devem ser averiguados e que a eficiência quântica do composto deve ser melhorada.

REFERÊNCIAS

ABREU, F. D., et al. Aryl-Substituted Ruthenium(II) Complexes: A Strategy for Enhanced Photocleavage and Efficient DNA Binding. v. 56. n. 15. p. 9084 – 9096. Julho, 2017.

AL-AHMAD, A. Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. *Crit Rev Microbiol.* v. 44, n. 5, p. 571 – 589, 2018.

ALMEIDA, M. I., et al. Prevalência e perfil de sensibilidade de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos clínicos de infecções hospitalares. *Revista Eletrônica de Enfermagem.* v. 09. n. 02. p. 489 – 495. Mai – Ago, 2007.

AHMED, I. et al. Recent Patents on Light-Based Anti-Infective Approaches. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* v. 13, n. 1, p. 70 – 88, 2018.

ARAGÃO, M.G.B., et al. Effect of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy on Mono- and Multi-Species Cariogenic Biofilms: A Literature Review. *Photomed Laser Surg.* v. 35, n. 5, p. 239 – 245, 2017

ARENAS, Y. et al. Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Ru(II)-based type I/type II photosensitizers. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* v. 10, n. 4, p. 615 – 625.

BABA, S. E. W. O., et al. Sensibilité aux antibiotiques des souches *Staphylococcus aureus* communautaires dans région de Nouakchott (Mauritanie). *The Pain African Medical Journal.* v. 24. p. 276, 2016.

BARTOLOMEU, M. et al. Effect of Photodynamic Therapy on the Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in microbiology.* v. 7, p. 267, 2016.

BECKER, KC. *et al.* Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 27 p. 870–926, 2014.

BISWAS, L., BISWAS, R., MANEESHA, K. S. An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. v. 309, n. 1, p. 1 – 12, 2018.

BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. Agr-mediated dispersal of staphylococcus aureus biofilms. *PLoS Pathog.* 2008.

BUCHALLA, W. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don't, *Critical Reviews in Microbiology.* v. 44, n. 5, p. 571 – 589, 2018.

BULLÉ, D. J., *et al.* Prevalência de *Staphylococcus aureus* metilina resistentes em profissionais de saúde. *Revista de enfermagem da UFRN.* v. 6, n. 2, p. 198 – 205, 2016.

CAMPOY, E.; COLOMBO M. I. Autophagy in intracellular bacterial infection, *Biochim Biophys.* v. 1793, n. 9, p. 1465 - 1477, 2009.

CATÃO, R. M. R. *et al.* Prevalência de infecções hospitalares por staphylococcus aureus e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. *Revista de Enfermagem,* v. 8, n. 7, p. 5257-5264, 2013.

CAVALCANTI, S. M. M., *et al.* Estudo comparativo da prevalência de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de terapia intensiva de hospital universitário, Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia.* n. 9, v. 4, p. 436 – 446, 2006.

SRIVASTAVA, P.; SHUKLA, M.; KAUL, G.; CHOPRA, S., PATRA, A. K. (2019). Rationally designed curcumin based ruthenium (ii) antimicrobials effective. *Staphylococcus aureus.* *Dalton Transactions,* 2019.

CZERWONKA, G., *et al.* benzimidazole-based ruthenium(IV) complex inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by interacting with siderophores

and the cell envelope, and inducing oxidative stress. *Biofouling*. v.35, n.1, p. 59 – 74, 2019.

DAVIA, K. et al. A porphyrin–ruthenium photosensitizer as a potential photodynamic therapy agent. *Inorganic Chemistry Communications*, v. 11, n. 5, p. 584-586, 2008.

DIRISALA, V. R., REDDY, N., SIRINAMA, K. *Infect. Dis.* v. 10, p. 1 – 15, 2017.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic therapy. *JNCI: Journal of the national cancer institute*, v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.

EICHNER, A., MAISCH, T., SP€ATH, A., GOLLMER, A., K€ONIG, B., REGENSBURGER, J., B€AUMLER, W. Fast and effective photodynamic inactivation of multiresistant bacteria by cationic riboflavin derivatives. v. 9, n. 12, p. 1 – 19, 2014.

FLEMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. *Nat Ver Microbiol*, 2010.

FREITAS, M.T.M., et al. Effect of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy on Mono- and Multi-Species Cariogenic Biofilms: A Literature Review. *Photomed Laser Surg.* v. 35, n. 5, p. 239 – 245, 2017.

FREITAS, M.A., PEREIRA, A.H., PINTO, J.G., CASAS, A., FERREIRA-STRIXINO, J. Viabilidade bacteriana após terapia fotodinâmica antimicrobiana com curcumina em *Staphylococcus aureus* multiresistente. *Microbiologia do Futuro*. Epub, v. 14, p. 739-748, 2019.

FONTANA, C. R. et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *Journal of periodontal research*, v. 44, n. 6, p. 751 - 759, 2009.

GASSER, G. et al. Encapsulation of a Ru(II) Polypyridyl Complex into Polylactide Nanoparticles for Antimicrobial Photodynamic Therapy. v. 12, n. 10, p. 1 – 10, 2020.

GOMES-FILHO, J.E., SIVIERI-ARAÚJO, G., SIPERT, C.R., DA SILVA SANTOS, L.M., DE AZEVEDO QUEIROZ, Í.O., MEN MARTINS, C., DO CARMO MAIA, N.K., CINTRA, L.T.A., DEZAN-JUNIOR, E., BAGNATO, V.S., CHAVES-NETO, A.H., DE OLIVEIRA, S.H.P. Evaluation of photodynamic therapy on fibroblast viability and cytokine production. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* v. 13, p. 97 – 100, 2016.

GROZAV, A. et al. Acute toxicity evaluation of a thiazolo arene ruthenium (II) complex in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 80, p. 233-240, 2016.

GU, Y. et al. In vitro photodynamic inactivation effects of Ru(II) complexes on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm cultures. *Photochem Photobiol.* v. 91, n. 1; p. 124 – 133, 2015.

HUANG, L. et al. Stable synthetic cationic bacteriochlorins as selective antimicrobial photosensitizers. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 54, n. 9, p. 3834-3841, 2010.

ISSA, M. C. A., MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. *Anais Brasileiros de Dermatologia.* v. 85, n. 4., p. 501 – 511. 2010.

JUZENIENE, A., et al. Eficácia de diferentes fontes de luz para terapia fotodinâmica com ácido 5-aminolevulínico. *Lasers Med Sci.* v. 19, p. 139 – 149, 2004.

KIM, M. M.; DARAFSHEH, A. (2020). Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology.* v.96, p. 280 – 294, 2020.

LAN, M., ZHAO, S., LIU, W. LEE,C., ZHANG, W. * and Pengfei Wang* Photosensitizers for Photodynamic Therapy *Adv. Healthcare Mater.* p. 1 – 37, 2019.

MARI, C. et al. Combination of Ru (II) complexes and light: new frontiers in cancer therapy. *Chemical science*, v. 6, n. 5, p. 2660-2686, 2015.

MAISCH T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. *Photochem Photobiol Sci.* v. 14, p. 1518–1526, 2015.

MAISCH T, BAIER J, FRANZ B, MAIER M, LANDTHALER M, SZEIMIES RM, BÉAUMLER W. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proc Natl Acad Sci.* v. 104, p. 7223–7228, 2007.

MCCONOUGHNEY, SJ. *et al.* Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiol.* v. 9 p. 987–1007, 2014.

MOHAMMED, Y. H. E., MANUKUMAR, H. M., RAKESH, K. P., KARTHIK, C. S., MALLU, P., & Qin, H.-L. Vision for medicine: Staphylococcus aureus biofilm war and unlocking key's for anti-biofilm drug development. *Microbial Pathogenesis.* v. 123, p. 339–347, 2018.

MOUSAVI, M, *et al.* Passive immunization against Pseudomonas aeruginosa recombinant PilA in a murine burn wound model. *Microb Pathog.* v.101 p. 83–88, 2016.

NAGATA, J. Y. et al. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, v. 9, n. 2, p. 122-131, 2012.

PERIASAMY, S. *et al.* How Staphylococcus aureus biofilms develop their characteristic structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 109 p. 1281–1286. 2012.

PLAETZER, K. et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers in medical science*, v. 24, n. 2, p. 259-268, 2009.

POON, C. T. et al. An amphiphilic ruthenium (II)-polypyridyl appended porphyrin as potential bifunctional two-photon tumor-imaging and photodynamic therapeutic agent. *J InorgBiochem.*, v.104, n. 1, p. :62-70, 2010.

PRAPHAKAR, RA.; MUNUSAMY, MA.; SADASIVUNI, KK.; RAJAN, M. Targeted delivery of rifampicin to tuberculosis-infected macrophages: design, in-vitro, and in-vivo performance of rifampicin-loaded poly (ester amide)s nanocarriers. *Int J Pharm.* v. 513, n. 1–2, p. 628–635, 2016.

QIAN-XIONG, Z. YANG, F., WEI-ZE, S.; XUE-SONG, W. Selective Photoinactivation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Highly Positively Charged Ru (II) Complexes. v. 25, p. 1 – 7, 2019.

RIBEIRO, M. et al. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial- material interactions. *Biomatter.* v. 2 p. 176–194. 2012.

SANTOS, A. L., et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SOUKOS, N. S. et al. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, v. 18, n. 3, p. 253-259, 1996.

VIDIMAR, V. et al. Induction of caspase 8 and reactive oxygen species by ruthenium-derived anticancer compounds with improved water solubility and cytotoxicity. *Biochemical pharmacology*, v. 84, n. 11, p. 1428-1436, 2012.

WAINWRIGHT M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* v. 42, p. 13–28, 1998.

WANG, Y., ZHOU, Q., WANG, Y., REN, J., ZHAO, H., WU, S., YANG, J., ZHEN, J., LUO, Y., WANG, X., GU, Y. In vitro photodynamic inactivation effects of Ru(II) complexes on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm cultures. *Photochem Photobiol.* v. 91, n. 1, p. 124 – 133, 2015.

YARWOOD, JM. et al. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol*, v. 186, p. 1838–1850, 2004.

ZANIN, I. C. J. et al. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 56, n. 2, p. 324-330, 2005.

ZANIN, I. C. J. et al. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *European journal of oral sciences*, v. 114, n. 1, p. 64-69, 2006.

APÊNDICE A

CONSTRUÇÃO DO REATOR FOTOQUÍMICO DE LED PARA PLACA DE 96 POÇOS

O sistema para fotoirradiação em placa de 96 poços foi projetado de acordo com as necessidades dos ensaios do projeto ao qual foi destinado, em que necessitava se irradiar 3 poços por vez. A fim de que nos ensaios biológicos fosse possível irradiar cada poço individualmente, optou-se por utilizar um LED em cada poço totalizando um conjunto de 3 LEDs RGB (red, green e blue – vermelho, verde e azul) e 3 LEDs UV soldados em paralelo uma placa de fenolite cobreada, tornando possível selecionar a cor que se deseja irradiar as amostras.

Para a construção do equipamento foram utilizando LEDs RGB de alto brilho de 5 mm, possibilitando assim a variação de luz no espectro visível. Para futuras pesquisas, também foram adicionados LEDs UV, para amostras que não absorvem no comprimento de luz visível. Todo material utilizado para a confecção da parte eletrônica foi adquirido em lojas de peças especializadas em componentes eletrônicos. Os LEDs tiveram os seus comprimentos de onda de emissão avaliados com um espectrofotômetro Ocean Optics USB2000 (Ocean Optics), a fim de determinar com maior precisão a faixa de energia em que as amostras estariam sendo irradiadas para os LEDs RGB foram avaliados a emissão nas cores individuais azul, vermelho e verde (Figura 5).

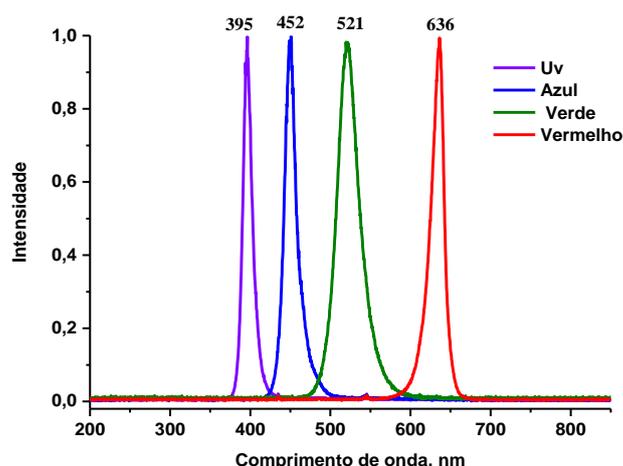


Figura 5 - Espectros de emissão dos LEDs utilizados.

Optou-se por utilizar no projeto uma placa Arduino como controlador, devido a sua facilidade de configuração, baixo custo e compatibilidade com diversos módulos tornando possível futuros upgrades, como por exemplo adicionar um módulo bluetooth para controlar o dispositivo via celular futuramente. Para o controle dos LEDs foram utilizadas as portas PWM do Arduino possibilitando assim não apenas acionar os LEDs mas também variar a intensidade do brilho dos mesmos, o que foi feito adicionando três botões as portas remanescentes do Arduino, um para selecionar a cor dos LEDs, um para aumentar a intensidade do brilho e o ultimo para diminuir a intensidade do brilho. Como a tensão de saída dos pinos do Arduino é de 5 V, foi necessário adicionar resistências para não queimar os LEDs, cada cor dos LEDs possui uma tensão de trabalho, então para cada cor foi acoplado uma resistência, tanto para limitar a tensão em cada LED, quanto para restringir a corrente em 15 mA afim de evitar que os LEDs superaqueceram e conseqüente gerem interferências nos ensaios fotoquímicos.

O valor adequado da resistência para cada tipo de LED foi calculado através da Lei de Ohm ($R = (V_{\text{alimentação}} - V_{\text{led}}) / I$), onde: R é a resistência em ohms do resistor adequado para o LED; $V_{\text{alimentação}}$ é a tensão em volts da fonte

de alimentação utilizada nos LEDs; V_{led} é a tensão em volts do LED (Tabela 1) e I é a corrente do LED em ampères (foi utilizado 15 mA).

Tabela 1- Valores de tensão suportadas, corrente, comprimento de onda e potência luminosa para as diferentes cores de LEDs.

LEDs				
Cor do LED	Tensão em Volts (V)	Corrente (mA)	Comprimento de onda (nm)	Potência luminosa (MCD)
RGB na cor vermelho	1,8-2,1	20mA	600-656	2500-3000
RGB na cor verde	2,5-3,0	20mA	485-570	15000-18000
RGB na cor azul	2,5-3,0	20mA	430-485	6000-8000
UV (Roxo)	3,0-3,7	20mA	380-420	300-400

O esquema eletrônico (Figura 6) do reator foi transferido para o programa PCBwizard onde foi dividido em duas placas, uma apenas para soldar os LEDs (placa de LED) e os cabos e a outra com os demais componentes eletrônicos (placa de interface). Toda a eletrônica foi montada em placas de fenolite cobreada. A confecção das placas se deu pelo método de transferência térmica, onde foram impressas as trilhas do circuito (Figura 7) em papel fotográfico, utilizando-se uma impressora a laser. Em seguida, utilizou-se um ferro de passar roupas, com temperatura alta o suficiente para transferir a tinta do papel fotográfico para a placa de fenolite cobreada, tomando cuidado para não queimar o papel.

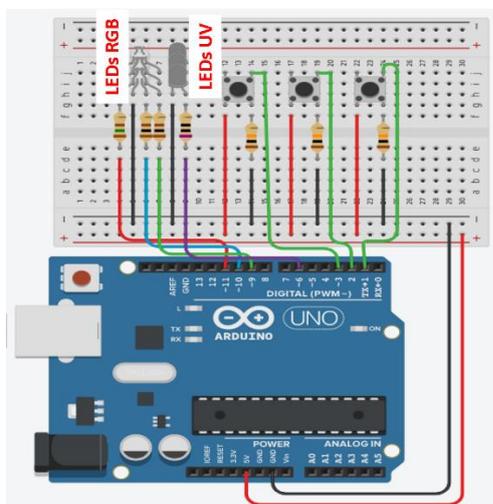


Figura 6 - Esquema eletrônico das ligações dos componentes eletrônicos ao Arduino.

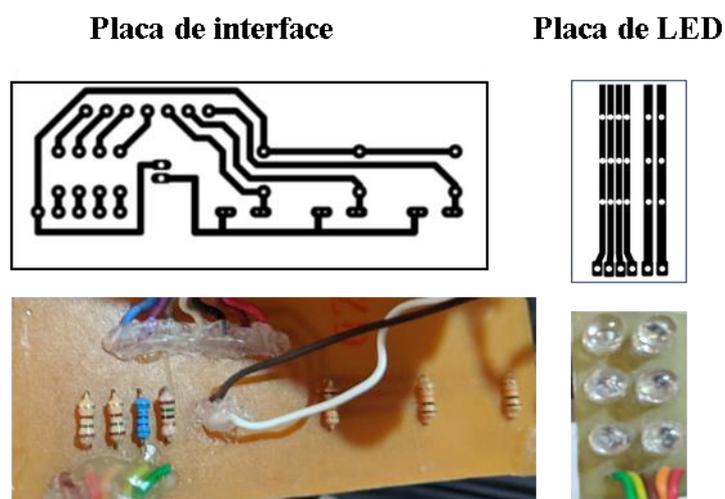


Figura 7 – Placas de interface e de LED, antes e após a confecção.

Após a etapa de transferência, as placas foram imersas em água até que o papel amolecesse, sendo em seguida retirado o papel cuidadosamente para

não danificar o desenho das trilhas. As placas foram mergulhadas em uma solução comercial de percloroato de ferro (cloreto férrico), aonde foram corroídas, tomando bastante cuidado para não exceder o tempo e corroer as trilhas do circuito impresso. Na sequência, elas foram lavadas com bastante água para a remoção de todo o percloroato de ferro. Posteriormente todos os componentes eletrônicos e cabos foram soldados as placas e ao Arduino, que por sua vez foi alimentado com uma fonte de 12V 1A. Como a placa Arduino Uno ocupa muito espaço, esta foi substituída por um Arduino pro mini, uma placa mais compacta e mais adequada para projetos simples e permanentes.

Para a parte mecânica do projeto optou se por utilizar um sistema cartesiano bidimensional para a movimentação dos ledes nos eixos x e y (Figura 4), o sistema opera de forma manual, tendo em vista que a automatização do sistema tornaria o custo mais elevado e requeria um conhecimento avançado de programação. A estrutura contendo a parte mecânica e o corpo do reator foi modelada utilizando o software Autodesk Fusion 360, sendo posteriormente impressa em uma impressora 3D Anet A8 plus mod, a parte mecânica foi impressa em ABS e as demais partes em PLA, utilizando-se altura de camada 0.2mm e velocidade de 30mm s⁻¹.

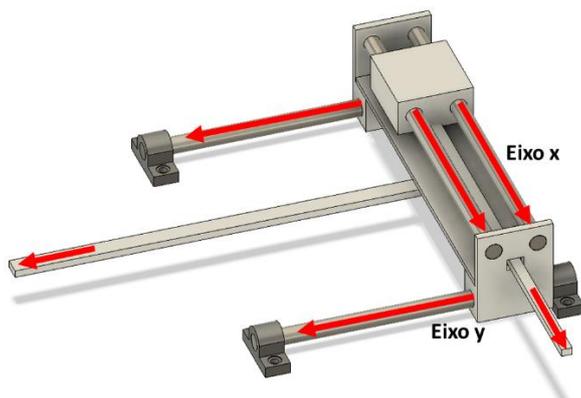


Figura 8: Sistema mecânico de movimentação dos LEDs nos eixos x e y

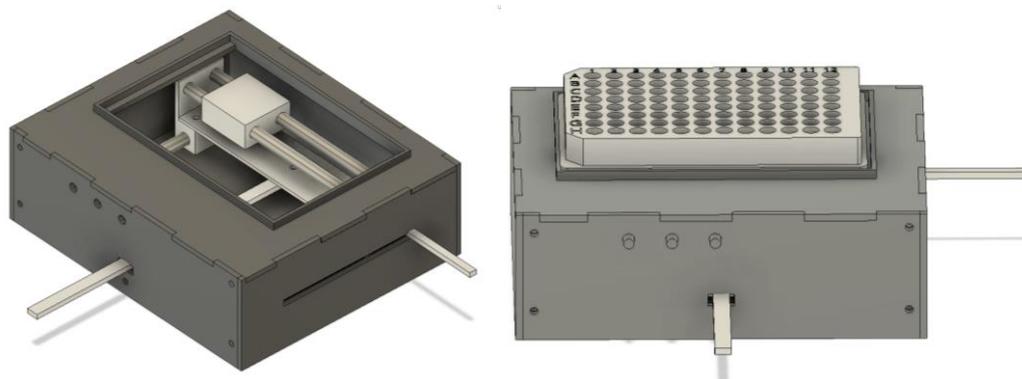


Figura 9. Desenhos esquemáticos para posterior impressão em impressora 3D.

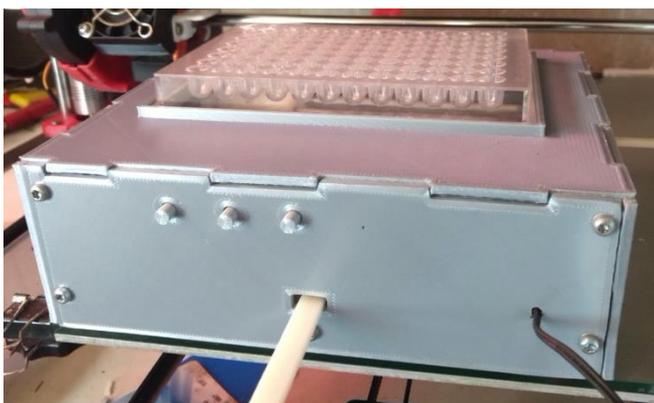


Figura 10. Imagem do dispositivo após impressão. Observa-se o correto encaixe da placa de cultura de células na parte superior do dispositivo.