

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

MARIA VITÓRIA SILVA PEREIRA

Estudo de tratamento oxidativo contra a persistência bacteriana induzida pelo
estresse à antibiótico

São Carlos
2024

MARIA VITÓRIA SILVA PEREIRA

Estudo de tratamento oxidativo contra a persistência bacteriana induzida
pelo estresse à antibiótico

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto de Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Físicas e Biomoleculares.

Orientador: Prof. Dr. Kate Cristina Blanco –
IFSC/USP.

São Carlos
2024

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

RESUMO

Introdução: A persistência bacteriana, fenômeno pelo qual uma subpopulação de células entra em estado de dormência metabólica tornando-se temporariamente tolerante à ação de antibióticos e assim sobrevivem em condições adversas, como o tratamento com antibióticos. **Objetivo:** Este estudo teve como principal objetivo caracterizar o comportamento persistente de uma cepa de *Staphylococcus aureus* e padronizar protocolos de Inativação Fotodinâmica (IFD) para avaliar mudanças fenotípicas decorrentes desse tratamento. **Material e métodos:** Foi avaliada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da oxacilina para *Staphylococcus aureus*, utilizando resazurina como indicador de atividade metabólica. A partir dos resultados da CIM foram realizados testes de tempo de morte “time-kill” utilizando concentrações de 10x e 50x a CIM e perfil de hereditariedade para caracterizar a persistência da cepa bacteriana utilizada. Foi realizada a inativação fotodinâmica (IFD) utilizando diferentes concentrações de curcumina como fotossensibilizador sob dose de luz em 450 nm. **Resultados:** O perfil de persistência bacteriana foi realizado e o MDK (tempo mínimo necessário para matar 99% e 99.99%) foi definido. Como principal resultado do tratamento, foi observada uma relação dose-dependente na redução da carga bacteriana. No entanto, as populações sobreviventes ao tratamento com IFD apresentaram um comportamento associado à tolerância, e a partir de novos testes de CIM foi descartada a hipótese de resistência adquirida. **Conclusão:** As EROs geradas na IFD pode ter contribuído para a tolerância observada, sugerindo a necessidade de testes adicionais, como o uso de um excedente de glicose para restaurar a atividade metabólica e a sensibilidade ao antibiótico, de forma a verificar a hipótese apresentada.

Palavras-chave: Inativação fotodinâmica, curcumina, persistência, Oxacilina, *Staphylococcus aureus*

1 INTRODUÇÃO

A resistência microbiana representa um desafio significativo para a saúde pública global, conforme vem sendo destacado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Salam et al. 2023). A OMS relata que as infecções causadas por bactérias resistentes contribuem substancialmente para a crescente ameaça da resistência antimicrobiana (RAM), podendo resultar em até 10 milhões de mortes anualmente até 2050, se medidas eficazes não forem implementadas (MURRAY et al, 2019; O'NEILL, 2016). A resistência bacteriana é um processo natural que vem sendo observado desde a descoberta dos primeiros antibióticos com a habilidade de bactérias desenvolverem fatores de resistência para sua sobrevivência portanto se replicando na presença de antibióticos, tipicamente obtida por meio de mutações, reduzindo a atividade de um antibiótico (O'NEILL, 2016; BALABAN et al, 2019; BRAUNER et al, 2017), que incluem desde mutações no DNA bacteriano, aquisição de genes de resistência por meio de transferência horizontal de genes, e modificações em alvos moleculares do antibiótico. Além da ameaça representada por bactérias resistentes, variantes tolerantes e persistentes também contribuem para as falhas dos tratamentos. A tolerância é um fenômeno a nível populacional que apresenta uma extensão do período no qual uma bactéria é capaz de sobreviver a uma dose letal de antibióticos sem um mecanismo de resistência. Foi demonstrado que esse aumento na sobrevivência proporciona uma janela de oportunidade para a população, facilitando a evolução da resistência (COHEN et al, 2013; LEVIN-REISMAN et al, 2017). Além disso, a tolerância pode proporcionar maior sobrevivência sob tratamento com antibióticos de diferentes classes, já que não apresenta um mecanismo de resistência específico à ação de uma classe de antibióticos. Uma forma de tolerância é conhecida como persistência, onde apenas uma subpopulação exibe características tolerantes, sendo caracterizada pela observação de curvas de morte bifásicas, sendo a primeira fase da curva representada pela morte rápida das bactérias suscetíveis, em que uma redução exponencial no número de células viáveis é observada após a introdução do antibiótico, seguida de uma diminuição da taxa de morte de uma subpopulação das bactérias, de forma que as persistentes permanecem viáveis por períodos extensos de tempo, mesmo na presença de altas concentrações de antibiótico (Figura 1). É importante destacar, também, que populações derivadas de sobreviventes persistentes apresentam a mesma curva de sobrevivência bifásica quando tratadas, sugerindo que a persistência não é uma característica hereditária, mas sim um traço fenotípico (SULAIMAN; LAM, 2021; BALABAN et al, 2019). No entanto, sua capacidade de crescer após o tratamento pode causar infecções prolongadas ou recorrentes, como no caso de algumas doenças

causadas pela bactéria *Staphylococcus aureus*. Na Figura 1 é observado que o tempo mínimo para morte de 99% (MDK₉₉) da população da cepa sensível e persistente é o mesmo, porém a persistente apresenta uma curva bimodal, na qual a população sensível morre rapidamente enquanto uma subpopulação persistente sobrevive por períodos mais longos. Dessa forma, a diferenciação em relação às sensíveis se dá pelo MDK_{99,99}, que é maior para as persistentes.

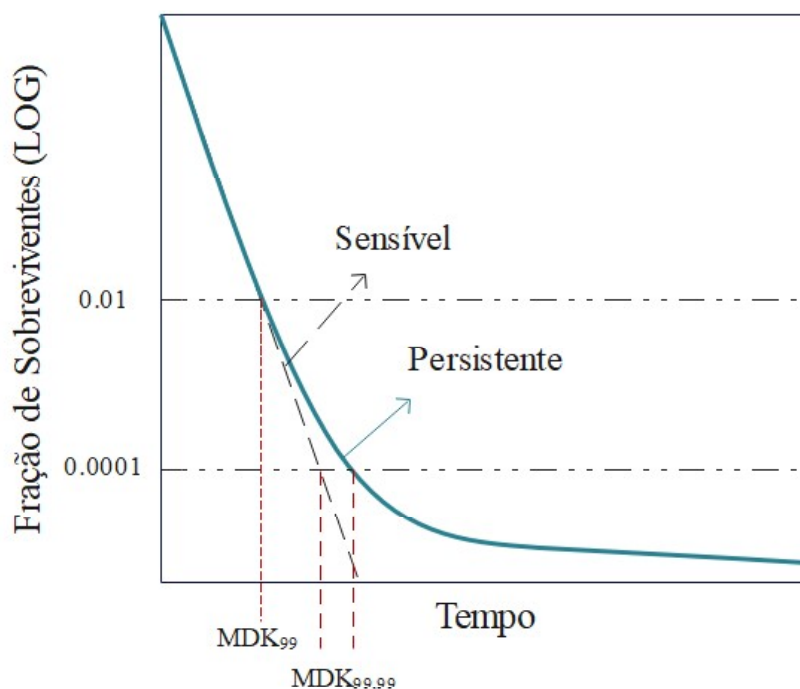


Figura 1 – Curvas de tempo de morte esperadas para bactérias sensíveis e persistentes considerando a fração de sobrevivência bacteriana. MDK₉₉ e MDK_{99,99} indicam o tempo mínimo necessário para matar 99% e 99.99% de uma população bacteriana sob condições específicas de tratamento, indicando a presença de uma subpopulação persistente com tolerância aumentada ao tratamento. Elaborado pelos autores.

A *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva que está entre os principais patógenos oportunistas em humanos, é capaz de adaptar-se a condições adversas causando infecções cutâneas e sistêmicas como endocardite, pneumonia, meningite, septicemia, osteomielite, entre outras, resultando algumas vezes em infecções fatais (ROWE et al, 2020). A *S. aureus* é encontrada na microbiota da mucosa nasal humana em 20–40% da população geral e quando as barreiras cutâneas e mucosas são rompidas, por exemplo, devido a doenças crônicas da pele como feridas ou intervenção cirúrgica, a bactéria é capaz de obter acesso aos tecidos subjacentes ou à corrente sanguínea, causando infecções (LEE et al, 2018).

A persistência microbiana leva a falhas no tratamento com antibiótico principalmente porque as células persistentes entram em um estado de dormência metabólica, tornando-se menos suscetíveis aos efeitos dos antibióticos que visam processos biológicos ativos (Salam et al. 2023). Esta heterogeneidade populacional, com a coexistência de células sensíveis e persistentes, permite que as persistentes sobrevivam ao tratamento e potencialmente recolonizem o sítio de infecção após a retirada do antibiótico (Li et al. 2024b). Além disso, ao reduzir sua atividade metabólica, as células persistentes podem evitar a detecção e eliminação pelo sistema imunológico do hospedeiro (Vasudevan et al. 2024). Um parâmetro a se considerar no tratamento de bactérias persistentes é o MDK (*Minimum Duration of Killing*), que indica o período mínimo necessário para erradicar uma proporção significativa de uma população microbiana (Li et al. 2024a). Um dos principais desafios na aplicação do MDK na prática clínica é a variabilidade entre diferentes espécies bacterianas e mesmo dentro de cepas da mesma espécie (Frizzell et al. 2024). Fatores como o local da infecção, a presença de biofilmes e a interação com o sistema imunológico do hospedeiro podem influenciar significativamente o MDK necessário para alcançar a erradicação microbiana (Sudha and Aranganathan 2024).

Uma opção para o tratamento de infecções bacterianas é a utilização da inativação fotodinâmica (IFD), uma técnica que produz espécies reativas de oxigênio (EROs) que desencadeiam uma cascata de reações de oxidação dentro da célula microbiana (Domka et al. 2024; Vieira et al. 2024). A IFD se baseia na interação da luz com moléculas fotossensíveis denominadas fotossensibilizadores (FS), levando à produção direta ou indireta de oxigênio singlete e outras espécies reativas de oxigênio, resultando em danos à componentes celulares vitais ao microrganismo.

Nesta técnica, através do Diagrama de Jablonski visualizado na Figura 2, ocorre a produção das espécies reativas é resultante da absorção de um fóton no comprimento de onda correspondente a banda de absorção da molécula fotossensibilizadora, resultando em dois tipos de reações: mecanismos de tipo I e de tipo II (Wang et al. 2024). No mecanismo de tipo I ocorre transferência de elétrons do FS no seu estado tripleto excitado com substratos no ambiente circundante, gerando íons-radicais que tendem a reagir com o oxigênio, resultando em produtos oxidados (EROs ou íons radicais). No mecanismo de tipo II, ocorre transferência de energia do FS no estado tripleto excitado para o estado tripleto fundamental do oxigênio, gerando o oxigênio singlete, que é apontado como o maior responsável pelo efeito fotodinâmico (PUCELIK; DĄBROWSKI, 2022).

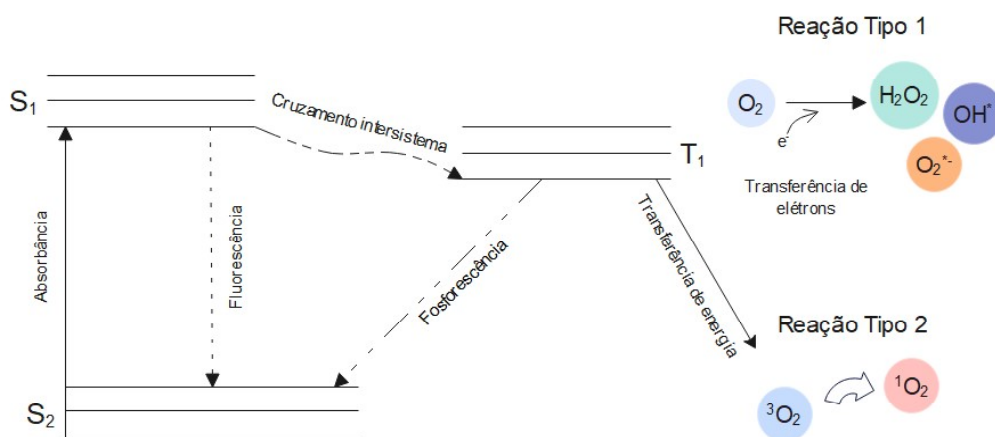


Figura 2 – Diagrama de Jablonski simplificado representando a inativação fotodinâmica. O mecanismo de tipo I representa a transferência de elétrons do FS no seu estado tripleto excitado com substratos no ambiente circundante, resultando em produtos oxidados (EROs ou íons radicais). No mecanismo de tipo II, ocorre transferência de energia do FS no estado tripleto excitado para o estado tripleto fundamental do oxigênio, gerando o oxigênio singlete. Elaborado pelos autores.

Entre os agentes fotossensibilizantes na IFD está a curcumina, um composto polifenólico extraído dos rizomas da cúrcuma (*Curcuma longa*), com uma ampla faixa de absorção (300nm-500nm) compatível com a luz azul. A eficácia da curcumina contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como *Staphylococcus aureus* (uma bactéria Gram-positiva que está entre os principais patógenos oportunistas em humanos, sendo capaz de adaptar-se a condições adversas causando infecções graves (ROWE et al, 2020) bem como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus intermedius*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Sarcina lutea* já foi demonstrada na literatura (MISHRA et al, 2004). A combinação da inativação fotodinâmica com a administração de antibióticos têm apresentado benefícios em relação à antibioticoterapia tradicional, com efeitos sinérgicos demonstrados na literatura (NIMA et al, 2021; SOARES et al, 2023). Aprofundar-se nesses mecanismos frente ao uso da terapia fotodinâmica para inativação de microrganismos persistentes constitui um desafio necessário em implicações diretas para a saúde pública. Portanto, considerando que a sobrevivência dessas células microbianas pode indiretamente facilitar o desenvolvimento de resistência antibiótica além de representar falhas em tratamentos, especialmente em ambientes onde a pressão seletiva dos antibióticos é mantida por subdosagens, propomos estudar neste projeto alterações de células persistentes nestes ambientes.

2 OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo é caracterizar o perfil de persistência da linhagem de *Staphylococcus aureus* por meio da curva “*Time Kill*” e de sua hereditariedade, visando também padronizar protocolos de Inativação Fotodinâmica (IFD) utilizando curcumina (fotossensibilizador) e luz (450 nm) para avaliar mudanças fenotípicas decorrentes do tratamento.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Foi utilizada a cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). As bactérias foram cultivadas diluindo células descongeladas de um estoque de *Brain Heart Infusion* (BHI) e glicerol (20%), a 37 °C e sob agitação de 150 rpm. Os inóculos posteriormente foram centrifugados a 3000 rpm e ressuspensos em Solução Salina Tamponada (PBS), sendo novamente centrifugados. Os inóculos foram padronizados em 10^7 a 10^8 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) através de análise da densidade óptica por meio da absorbância em 600 nm (Cary UV-Vis50, Varian).

3.2 Bactérias Persistentes

Concentração Inibitória Mínima (CIM). A determinação da CIM foi baseada nas diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), com diferentes concentrações do antibiótico Oxacilina. O agente antimicrobiano foi distribuído em placas de 96 poços por meio de diluição sequencial em meio líquido de *Muller Hilton* e o inóculo bacteriano foi posteriormente adicionado aos poços em uma concentração final de 10^8 UFC/mL. Foram realizados, também, o controle positivo de crescimento bacteriano e o controle negativo do meio de cultura, armazenando a placa a 37 °C por 24 horas. Após 24h de incubação a 37 °C, a solução de resazurina (0,002%) foi adicionada aos respectivos poços e mantida por 4 horas a 37 °C para determinação da CIM de cada antibiótico, que foi definida como a menor concentração do antibiótico com capacidade de inibir o crescimento visível das cepas bacterianas.

Time-Kill. A cultura cultivada overnight foi diluída na proporção de 100 µL para 20 mL de meio de cultura Muller Hilton e mantida em agitação a 150 rpm e 37 °C por 3h. Ao atingir a fase MID-LOG no crescimento exponencial foram coletadas amostras em uma concentração final de 10^8

UFC/mL da cultura, que foram incubadas novamente a 150 rpm e 37 °C com a adição dos antibióticos. Em intervalos pré-determinados foram coletadas, lavadas por centrifugação e diluídas amostras da cultura incubada, que, então, foram diluídas 6 vezes e plaqueadas por gotas de 10 µL de cada diluição em uma laca de Petri para determinação da UFC/mL. A fase de platô na curva time-kill foi analisada para a existência de células persistentes e as bactérias sobreviventes foram coletadas para o teste de hereditariedade.

Hereditariedade. Uma cultura bacteriana cultivada overnight foi diluída na proporção de 100 µL para 20 mL de meio de cultura Muller Hilton e mantida em agitação a 150 rpm e 37 °C por 3h. Serão adicionados os antibióticos estudados e a cultura será novamente mantida em agitação a 150 rpm e 37 °C por 24h de forma a obter a lise de um subconjunto da população. As células sobreviventes serão sedimentadas por centrifugação (4000 rpm, 5 min) e ressuspensas em 20 mL de meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) para, novamente, serem cultivadas em agitação a 150 rpm e 37 °C de 16-24h. Posteriormente, as amostras da nova população derivada de células persistentes serão novamente testadas quanto à sobrevivência ao tratamento com os antibióticos testados. O procedimento será repetido quatro vezes.

3.3 Inativação Fotodinâmica

Foi preparada uma solução estoque de curcumina (fotossensibilizador, FS) a 5 mM em álcool etílico, posteriormente diluída em água destilada para obter uma concentração final de 1 µM. Foram estabelecidos três grupos de controle: controle geral (bactérias + PBS), controle escuro (bactérias + FS), e controle luz (bactérias + luz), além do grupo de tratamento com IFD (bactérias + FS + luz). Nos grupos IFD e escuro, 500 µL da suspensão bacteriana foram adicionados em poços de uma placa de 24 poços, juntamente com 500 µL da solução de curcumina, sendo mantidos no escuro a 37°C por 15 minutos. Após esse período, os grupos de controle luz e IFD foram irradiados com 2,5 J/cm² utilizando um dispositivo baseado em LED (Biotable®) com comprimento de onda de 450 nm e potência de 40 mW.

A dose de luz utilizada foi calculada por meio da equação 1 em que:

$$D = I \cdot t \quad (\text{Equação 1})$$

D: Dose (fluência);

I: Intensidade (mW/cm²);

t: Tempo de Irradiação (s).

As amostras foram então diluídas e plaqueadas para determinar o número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) sobreviventes. As bactérias restantes foram centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura *Mueller-Hinton*, sendo posteriormente transferidas para tubos Falcon contendo 10x e 50x a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do antibiótico. As amostras foram coletadas, diluídas e plaqueadas a cada hora para determinar o UFC/mL, seguindo a metodologia previamente estabelecida para o ensaio de time-kill.

3.4 Análise Dos Resultados

A forma de análise dos resultados seguiu a partir dos objetivos específicos do estudo, considerando que a hipótese de reduzir o número e/ou o tempo (MDK) de sobrevivência das bactérias utilizando o método fotônico oxidativo proposto e dos métodos de coleta de dados descritos na metodologia seguindo a sequência de análises de efeitos inibitórios microbianos observados a partir do uso da IFD.

4 RESULTADOS

Caracterização da persistência bacteriana

Concentração inibitória mínima: A CIM é definida como a menor concentração de um antibiótico necessária para inibir o crescimento visível de uma bactéria após um período de incubação, geralmente de 18 a 24 horas. Essa medida é essencial para avaliar a eficácia de antibióticos contra cepas bacterianas específicas, fornecendo uma base quantitativa para a escolha de terapias antimicrobianas adequadas.

Neste estudo, foi determinada a CIM da Oxacilina para *Staphylococcus aureus* utilizando o corante indicador resazurina. A resazurina é um composto azul não fluorescente que serve como indicador de atividade metabólica na célula, sendo reduzida a resorufina, um composto rosa fluorescente, em resposta à atividade metabólica das células bacterianas viáveis. Esse processo de redução indica a presença de bactérias metabolicamente ativas, o que provoca a mudança de cor de azul para rosa. Assim, na avaliação da CIM, a ausência de alteração da cor (manutenção do azul) indica a inibição completa do crescimento bacteriano, enquanto a mudança de azul para rosa reflete

o crescimento bacteriano ativo, significando que a concentração do antibiótico não foi suficiente para inibir a atividade metabólica da célula (ELSHIKH et al. 2016). No presente experimento, a CIM da Oxacilina obtida para a cepa de *Staphylococcus aureus* estudada foi de 0,125 µg/mL, classificando a bactéria como sensível ao antibiótico, conforme os parâmetros do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). A partir da CIM obtida foi possível, então, calcular as dosagens apropriadas para a utilização de 10x e 50x a CIM da Oxacilina nos testes de time-kill. É possível observar na Figura 3 um ensaio de Concentração Inibitória Mínima (MIC) em diferentes diluições de oxacilina, variando de 32 a 0,016.

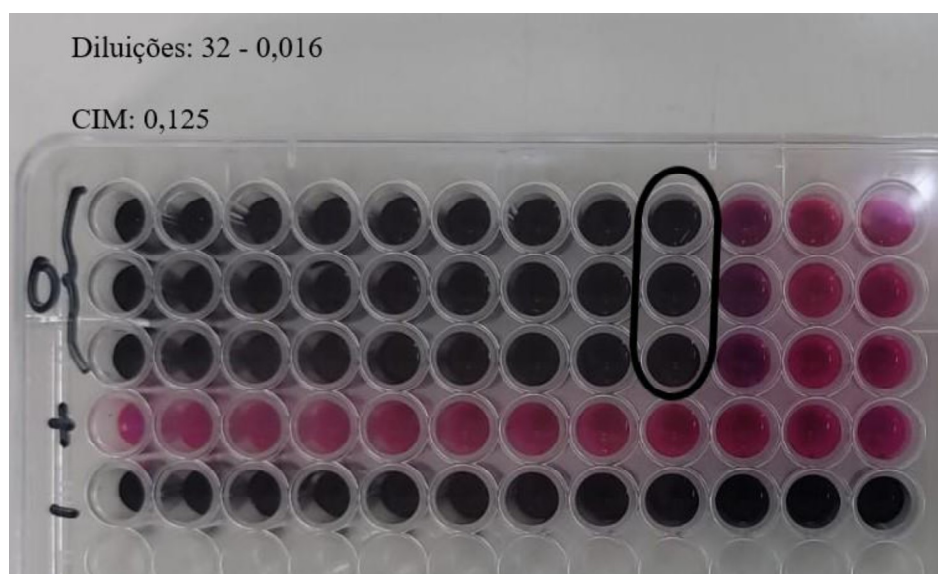


Figura 3 – CIM da Oxacilina obtida para a cepa de *Staphylococcus aureus* estudada, com diluições de 32 a 0,016 µg/mL. Elaborado pelos autores.

Na parte inferior da placa, em coloração escura (roxo uniforme), está o controle negativo, onde o meio de cultura e o composto antimicrobiano estão presentes, mas sem a inoculação de microrganismos, indicando a ausência de crescimento bacteriano. Na linha superior ao controle negativo está o controle positivo (coloração rosa que indica viabilidade dos microrganismos), esses poços contêm microrganismos inoculados, mas não possuem o composto antimicrobiano, permitindo o crescimento bacteriano. Acima, a figura demonstra um gradiente de diluições do antibiótico, sendo possível observar a inibição gradual do crescimento até alcançar a MIC, definida como 0,125, onde ocorre a transição visível entre a coloração escura (sem crescimento) e rosa (com crescimento). A resazurina foi o indicador redox utilizado para avaliar a viabilidade celular neste ensaio, com a

mudança de cor (de azul para rosa) na presença de atividade metabólica foi permitido realizar a relação com crescimento microbiano.

Time-Kill: A fim de classificar se a população estudada de fato apresenta características associadas à persistência foram realizados os testes de time-kill para 10x e 50x a CIM obtida para Oxacilina. A partir da cinética de morte observada para as bactérias é possível inferir a presença de uma curva bifásica típica observada durante o tratamento de populações bacterianas contendo fenótipos persistentes, na qual a primeira fase da curva representa a morte rápida das bactérias suscetíveis, em que uma redução exponencial no número de células viáveis é observada após a introdução do antibiótico, seguida de uma diminuição da taxa de morte de uma subpopulação das bactérias, de forma que as persistentes permanecem viáveis por períodos extensos de tempo, mesmo na presença de altas concentrações de antibiótico. Ao utilizar concentrações de 10x e 50x o valor da CIM das bactérias é possível avaliar a fraca dependência da taxa de morte dos fenótipos persistentes em relação a quantidades de antibióticos muito superiores a CIM, que ocorre devido a um estado de dormência metabólica no qual processos biológicos essenciais, como a divisão celular e a síntese de proteínas, são reduzidos ou interrompidos, minimizando os alvos moleculares do antibiótico, geralmente dependentes de células metabolicamente ativas (BALABAN et al, 2019). Na Figura 4 é visualizada a curva de morte de *Staphylococcus aureus* utilizando 10x e 50x a CIM para o antibiótico Oxacilina.

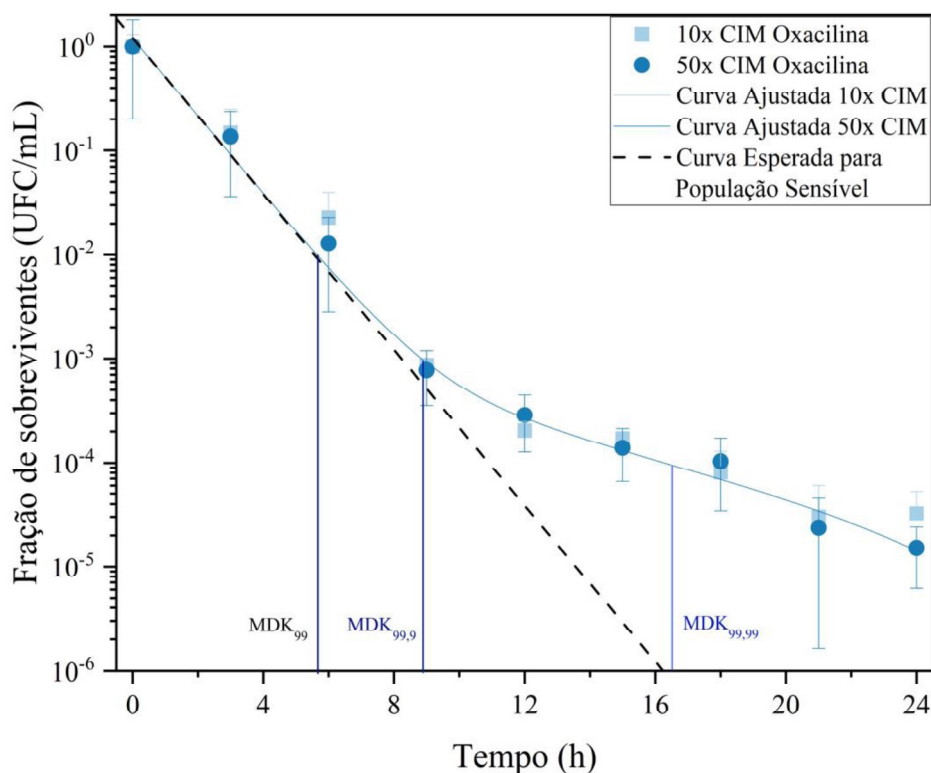


Figura 4 – Curva de morte de *Staphylococcus aureus* utilizando 10x e 50x a CIM para o antibiótico Oxacilina. As curvas ajustadas para os pontos coletados para 10x e 50x a CIM durante 24h apresentam comportamento bifásico típico de populações com fenótipos persistentes. A curva tracejada representa o comportamento esperado para populações de bactérias sensíveis. Elaborado pelos autores.

A análise do gráfico de tempo de morte das bactérias expostas a 10x e 50x a CIM de Oxacilina (Figura 4) revela um comportamento típico de persistência, que distingue essas subpopulações das bactérias suscetíveis. A curva bifásica observada inicia com uma fase de rápida queda no número de células viáveis após a exposição ao antibiótico, correspondendo à eliminação das células suscetíveis. Nessa fase inicial, o Tempo Mínimo para Morte – MDK₉₉ é semelhante ao esperado para bactérias sensíveis, indicando que uma fração significativa da população é eliminada rapidamente. Entretanto, a taxa de morte desacelera drasticamente em uma segunda fase, refletindo a presença de uma subpopulação persistente. Nesse ponto, o MDK_{99,99} se encontra deslocado temporalmente em relação ao esperado para populações sensíveis. Esse deslocamento é um marcador do fenótipo persistente, indicando que essas células conseguem sobreviver por um período prolongado, mesmo sob concentrações elevadas do antibiótico.

O comportamento das persistentes é consistente tanto em 10x quanto em 50x a CIM, demonstrando que, uma vez muito acima da CIM, o aumento da concentração de Oxacilina não

acelera significativamente a eliminação dessas células. Isso reforça a característica de baixa dependência da concentração do antibiótico que as células persistentes exibem, evidenciando que sua sobrevivência está mais relacionada ao seu estado fenotípico de dormência do que à capacidade de resistir ao antibiótico em si.

Hereditariedade: Outro marcador importante da persistência é o fato de células persistentes não transportarem mutações genéticas para sua sobrevivência, de forma que seu estado de dormência e tolerância aos antibióticos não é herdado no sentido tradicional de transmissão de traços genéticos. Em vez disso, as persistentes surgem de forma estocástica dentro de uma população bacteriana, o que indica que o fenótipo de persistência resulta de heterogeneidade fenotípica e não de variação genética. Esse mecanismo não hereditário é uma característica que define a persistência aos antibióticos e que a diferencia da resistência a antibióticos (BALABAN et al, 2019). Na Figura 5 é observado o perfil de hereditariedade da persistência em *S. aureus* após time kill (Figura 3). Foram realizados testes durante 3 dias, nos quais as células persistentes sobreviventes ao tratamento com antibiótico foram coletadas para novas análises, sendo D0: Dia 0, população sensível; D1: Dia 1, população derivada das sobreviventes persistentes de D0; e D2: Dia 2, população derivada das sobreviventes persistentes de D1.

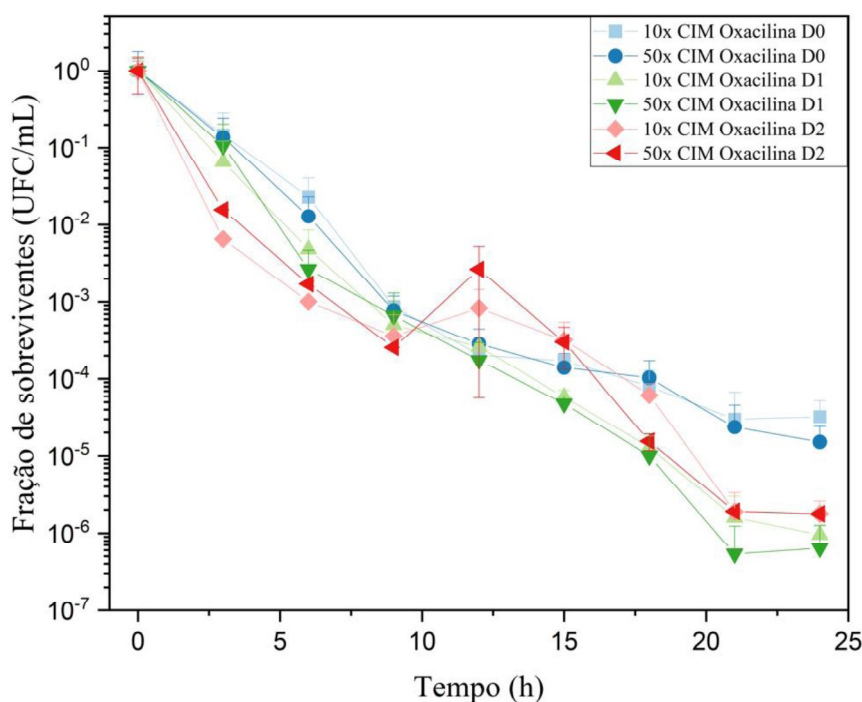


Figura 5 – Curva de morte de *Staphylococcus aureus* utilizando 10x e 50x a CIM para o antibiótico Oxacilina. D0: Dia 0, população sensível; D1: Dia 1, população derivada das sobreviventes persistentes de D0; e D2: Dia 2, população derivada das sobreviventes persistentes de D1 Elaborado pelos autores.

A análise da cinética de morte das bactérias apresentada na Figura 5 revelou uma curva bifásica típica, indicando a presença de uma subpopulação de células persistentes. As novas populações derivadas das células persistentes sobreviventes aos tratamentos antibióticos anteriores, D1 e D2, exibiram o mesmo comportamento da população original, sem aumento na proporção de persistentes. Isso sugere que, como esperado para o fenótipo persistente, a população mantém um estado fenotípico reversível, no qual as bactérias não transmitem essa característica de dormência às suas descendentes.

Juntamente com os resultados anteriores é possível concluir que a população analisada é, de fato, uma população persistente. Essa conclusão é apoiada pela ausência de mudanças na CIM em comparação com bactérias sensíveis, o que poderia em outro caso indicar a possibilidade de heterorresistência. Além disso, a população apresentou uma curva de morte bifásica, característica de persistência, e manteve uma taxa de sobrevivência consistente, independentemente das concentrações de oxacilina testadas (10x e 50x acima da CIM). O estado fenotípico demonstrou ser reversível, pois as populações derivadas das células persistentes sobreviventes apresentaram comportamento similar na cinética de morte, confirmando a natureza não hereditária da persistência.

Optimização da Inativação Fotodinâmica

Os testes de IFD visaram avaliar o efeito de diferentes concentrações de curcumina na sobrevivência da *Staphylococcus aureus*, mantendo-se doses de luz aplicadas em 2,5 J/cm² e 5 J/cm² (Figura 6).

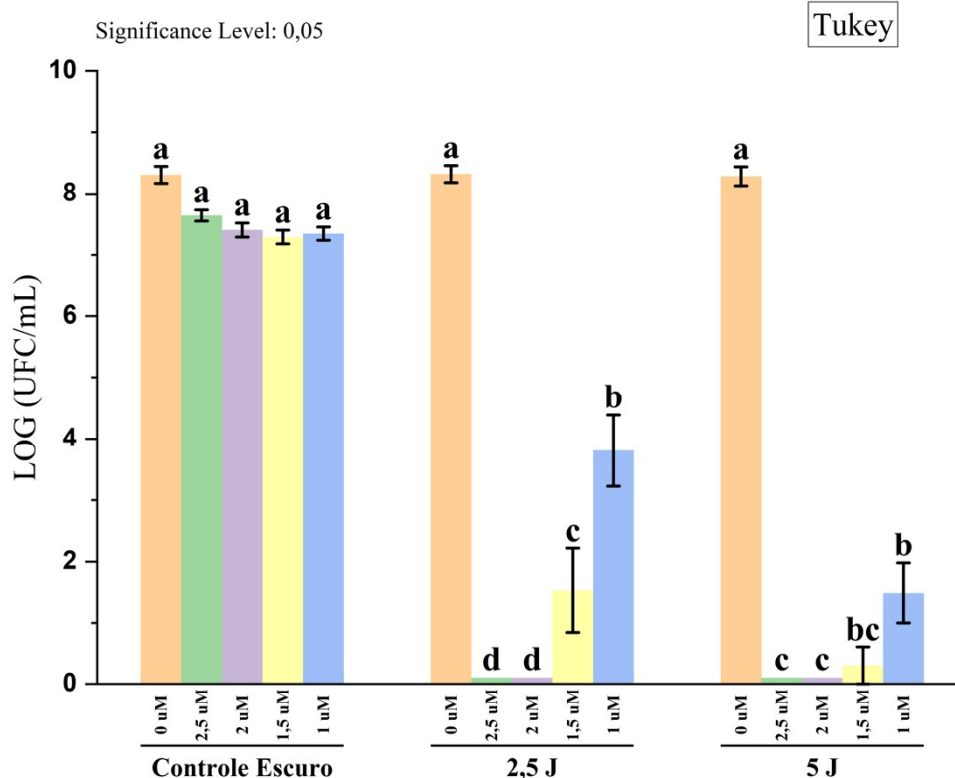


Figura 6 – Gráfico de Inativação Fotodinâmica (IFD) demonstrando a sobrevivência de *Staphylococcus aureus* com controle escuro com concentrações de curcumina de 2,5 a 1 μ M, controles de dose de luz de 2,5 e 5 J/cm² e IFD com doses de luz fixas para diferentes concentrações de curcumina, observando carga bacteriana indetectável para as concentrações de 2 e 2,5 μ M para ambas as doses de luz. Letras distintas indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$. Elaborado pelos autores.

A escolha de diferentes concentrações do fotossensibilizador permite analisar a relação dose-resposta, observando como a quantidade de curcumina influencia a produção de EROs e, consequentemente, o nível de inativação bacteriana. Nos grupos controle (escuro e luz sem curcumina), não se observou atividade tóxica, não havendo redução estatisticamente significativa da carga bacteriana e demonstrando que a toxicidade depende da combinação do fotossensibilizador com a luz e os resultados de IFD são decorrentes das espécies reativas de oxigênio formadas. Nos grupos tratados com IFD verificou-se uma redução significativa da carga bacteriana, proporcional ao aumento da concentração de curcumina, com redução de 4,5 Log (UFC/ml) para 1 μ M de curcumina e 2,5 J/cm², a menor concentração e dose de luz avaliada. Para 1,5 μ M de curcumina e 2,5 J/cm² foi reduzido 6,8 Log (UFC/ml) e para 1 μ M e 1,5 μ M com 5 J/cm² a redução observada foi de 6,8 e 7,9 Log (UFC/ml) respectivamente. Foi observada que a carga bacteriana nas concentrações de 2 μ M e 2,5 μ M para ambas as doses de luz utilizadas foi indetectável. Após os testes, o grupo de tratamento que apresentou

menor redução de carga bacteriana, 1 μM de curcumina e 2,5 J/cm^2 , foi selecionado para aplicação de novos testes de time-kill, de forma a analisar o comportamento da cinética de morte das bactérias após inativação fotodinâmica.

Efeito da Inativação Fotodinâmica em *S. aureus* persistente

Para avaliar se a aplicação de inativação fotodinâmica (IFD) alterou o comportamento e a cinética de morte da população bacteriana estudada, foram realizados novos testes de time-kill nas populações sobreviventes ao tratamento com IFD. A Figura 7 apresenta a comparação entre a população inicial e a população pós-tratamento, onde se observou um comportamento associado a tolerância ou resistência na população pós-IFD. Para determinar se essa mudança indicava a presença de bactérias resistentes, foi realizado um novo teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM), que revelou os mesmos valores aos apresentados pela população original sensível, descartando a hipótese de resistência adquirida.

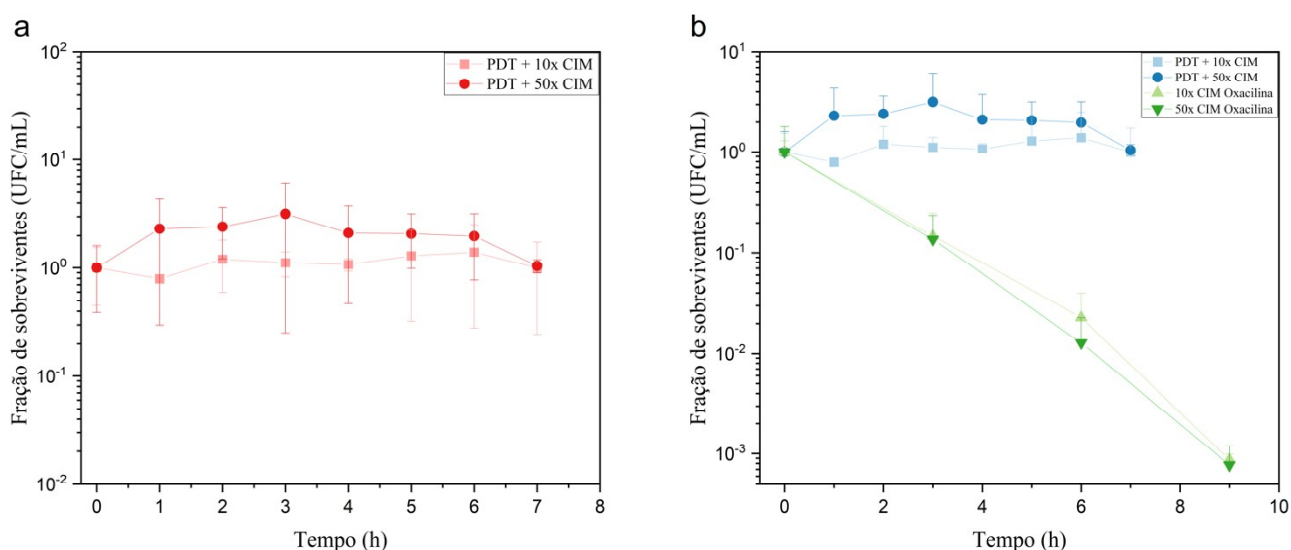


Figura 7 – Curva de morte de *Staphylococcus aureus* utilizando 10x e 50x a CIM para o antibiótico Oxacilina após aplicação de Inativação Fotodinâmica (1 μM e 2,5 J/cm^2). Elaborado pelos autores.

Um ponto relevante de discussão nesse contexto é a hipótese de que essa alteração de comportamento pode estar associada ao papel das espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas pela curcumina durante a IFD.

A curcumina possui baixo rendimento quântico de $^1\text{O}_2$, com valores de 0,01 quando em solução de etanol, em comparação a valores entre 0,5 e 0,8 para fotossensibilizadores como porfirinas, ftalocianinas e clorinas. Isso significa que embora ela absorva luz, apenas uma pequena proporção

dessa energia é convertida em oxigênio singleto. Dessa forma, a curcumina tende a produzir menos oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) em comparação com outros fotossensibilizadores utilizados na inativação fotodinâmica, gerando predominantemente espécies reativas de oxigênio, como radicais livres (superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$ e radical hidroxila $\text{OH}^\cdot$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (DIAS et al, 2020; MELO et al, 2021).

De acordo com Rowe e colaboradores (2019), as espécies reativas de oxigênio podem induzir um estado de tolerância em *Staphylococcus aureus*, estimulando a bactéria entrar em estados de dormência ou reduzir suas atividades metabólicas, favorecendo a sobrevivência de células bacterianas. Esse efeito se deve à inativação de vias metabólicas cruciais por meio do estresse oxidativo gerado pelas EROs, diminuindo a geração de ATP e colocando as bactérias em um estado de baixa atividade que pode torná-las temporariamente tolerantes. Portanto, a geração de EROs pela curcumina pode ter contribuído para a indução de um estado de tolerância em *S. aureus*, onde as células sobreviventes ao tratamento com IFD entraram em um estado de dormência ou baixa atividade metabólica.

Um possível teste para elucidar essa hipótese é a aplicação de um excedente de glicose no meio, que, como realizado no experimento de ROWE et al, aumentaria a geração de ATP através de fosforilação em nível de substrato, consequentemente restaurando a susceptibilidade das células ao antibiótico.

5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi possível observar, após a identificação da sensibilidade bacteriana através determinação da CIM da Oxacilina, que a análise das curvas de morte das bactérias revelou um padrão bifásico característico de populações bacterianas com fenótipos persistentes, evidenciando a presença de uma subpopulação de células capazes de sobreviver em concentrações elevadas de antibiótico devido a um estado de dormência metabólica. Além disso, os experimentos de IFD com diferentes concentrações de curcumina confirmaram sua eficácia na redução da carga bacteriana de forma dose-dependente. No entanto, testes de time-kill realizados em populações sobreviventes à IFD indicaram a possível indução de tolerância em *Staphylococcus aureus*, associada à geração de EROs pela curcumina. Considerando que a curcumina possui um baixo rendimento quântico para a produção de oxigênio singleto, mas é eficiente na geração de radicais livres e peróxido de hidrogênio, esses resultados indicam que o estresse oxidativo pode ter levado as células sobreviventes a um estado de

baixa atividade metabólica, hipótese reforçada pela similaridade na CIM das populações pré e pós-IFD. Com base nos resultados obtidos, testes futuros poderiam incluir abordagens que visem reverter o estado de dormência, como a suplementação de glicose para aumentar a produção de ATP e restaurar a sensibilidade bacteriana aos antibióticos.

REFERÊNCIAS

- BALABAN, N. Q. *et al.* Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 7, p. 441–448, 2019.
- BRAUNER, A. *et al.* An Experimental Framework for Quantifying Bacterial Tolerance. **Biophysical Journal**, v. 112, n. 12, p. 2664, 2017.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
- COHEN, N. R., *et al.* Microbial persistence and the road to drug resistance. **Cell Host Microbe**, v. 13, n.6, p. 632–642, 2013.
- DIAS, L.D. *et al.* Curcumin as a photosensitizer: From molecular structure to recent advances in antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 45, p. 100384, 2020.
- DOMKA, W; BARTUSIK-AEBISHER, D; MYTYCH, W; *et al* Photodynamic Therapy for Eye, Ear, Laryngeal Area, and Nasal and Oral Cavity Diseases: A Review. **Cancers (Basel)**, v. 16, p. 645, 2024.
- ELSHIKH, M., AHMED, S., FUNSTON, S. *et al.* Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology Letters**, v. 38, p. 1015–1019, 2016.
- FRIZZELL, J. K; TAYLOR, R. L; RYNO, L. M. Constitutive Activation of RpoH and the Addition of L-arabinose Influence Antibiotic Sensitivity of PHL628 E. coli. **Antibiotics**, v. 13, p. 143, 2024.
- KEREN, I. *et al.* Persister cells and tolerance to antimicrobials. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 1, p 13-18, 2004.
- LEVIN-REISMAN, I. *et al.* Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. **Science**, v. 355, n. 6327, p. 826–830, 2017.
- LI, C; OUYANG, Z; LIU, J; Bacterial growth and cultivation. **Molecular Medical Microbiology**, Elsevier, p. 155–175, 2024.
- LI, P; PAN, J; DONG, Y; *et al.* Microenvironment responsive charge-switchable nanoparticles act on biofilm eradication and virulence inhibition for chronic lung infection treatment. **Journal of Controlled Release**, v. 365, p. 219–235, 2024.
- MARTINS ANTUNES DE MELO, W. C; CELIEŠIŪTĖ-GERMANIENĖ, R; ŠIMONIS, P; STIRKĖ, A. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) for biofilm treatments. Possible synergy between aPDT and pulsed electric fields. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 2247–2272, 2021.

- MISHRA, S. *et al.* Design, development and synthesis of mixed bioconjugates of piperic acid-glycine, curcumin-glycine/alanine and curcumin-glycine-piperic acid and their antibacterial and antifungal properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 5, p. 1477–1486, 2005.
- MOREIRA, L. B. Princípios para uso racional de antimicrobianos. **Revista AMRIGS**, v. 48, n. 2, p. 118–120, 2004.
- MURRAY, C.J. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022.
- NIMA, G. *et al.* Photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans* by curcumin in combination with EDTA. **Dental Materials**, v. 37, n. 1, p. e1–e14, 2021.
- O’Neill J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: final report and recommendations. 2016.
- PETERSON, E.; KAUR, P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. NOV, p. 2928, 2018.
- PUCELIK, B.; DĄBROWSKI, J. M. Photodynamic inactivation (IFD) as a promising alternative to current pharmaceuticals for the treatment of resistant microorganisms. **Advances in Inorganic Chemistry**, v. 79, p. 65–103, 2022.
- ROWE, S. E. *et al.* Reactive oxygen species induce antibiotic tolerance during systemic *Staphylococcus aureus* infection. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 282–290, 2020.
- SALAM MA, AL-AMIN MY, SALAM MT, *et al* Antimicrobial resistance: a growing serious threat for global public health. **Healthcare**. MDPI, p. 1946, 2023.
- SONG, M. *et al.* A broad-spectrum antibiotic adjuvant reverses multidrug-resistant Gram-negative pathogens. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 1040–1050, 2020.
- SUDHA, S. S; ARANGANATHAN, V. Antibiofilm Analysis, Synergistic Potential and Biocompatibility Evaluation of a Bacteriocin from *Bacillus subtilis* (MK733983). **Indian Journal Microbiology**, p. 1–18, 2024.
- SULAIMAN, J. E.; LAM, H. Evolution of Bacterial Tolerance Under Antibiotic Treatment and Its Implications on the Development of Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 431, 2021.
- TRONCOSO, A. T. Atualidades em resistência bacteriana: uma revisão bibliográfica. **Revista da Faculdade de Medicina de Teresópolis**, v. 4, n. 1, 2020.
- VASUDEVAN, S; DAVID, H; CHANEMOUGAM, L; *et al* Emergence of persister cells in *Staphylococcus aureus*: calculated or fortuitous move? **Critical Reviews in Microbiology**, v. 50, p. 64–75, 2024.
- VIEIRA, S. M; MIMA, E. G. O; HONÓRIO, H. M; *et al* A protocol for an overview of systematic reviews to map photodynamic inactivation evidence in different dental specialties. **Photochem Photobiol Sci**, p. 1–8, 2024.

WANG, H; GUO, S; YUAN, Q; *et al* Cationic Conjugated Oligomers for Efficient and Rapid Antibacterial Photodynamic Therapy via Both Type I and Type II Pathways. **Chinese J Chem**, v. 42, p. 61–66, 2024.