

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Iago Silva e Carvalho

Otimização da terapia Sonofotodinâmica mediada pela Curcumina contra
biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*

São Carlos
2022

Iago Silva e Carvalho

Otimização da terapia Sonofotodinâmica mediada pela Curcumina contra
biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*

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. Vanderlei Salvador
Bagnato - IFSC - USP.

São Carlos
2022

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

Bactérias são responsáveis pela maioria das doenças infecciosas, além de ser uma das maiores causas de morte no século passado. Felizmente soluções químicas como os antibióticos foram desenvolvidas e controlaram de forma eficiente o surgimento de novos casos, bem como as mortes por tais agentes infecciosos. Porém, rapidamente perfis de resistência surgiram nas mais diferentes cepas ao redor do mundo, trazendo à tona novamente o perigo que pode ser viver em um mundo sem o controle sobre as bactérias. Tratamentos alternativos surgem, como é o caso da terapia fotodinâmica (PDT), sonodinâmica (SDT) e sonofotodinâmica (SPDT). O presente trabalho busca caracterizar diferentes arranjos experimentais, bem como otimizar os parâmetros para tais tratamentos, que é de extrema importância para o avanço dessas tecnologias. Dessa forma, os resultados demonstram que ensaios *in vitro* com biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* com SPDT é capaz de erradicar pela totalidade o biofilme formado, bem como a mudança da forma de aplicação do ultrassom influencia a eficácia do tratamento. Arranjos distintos mostram diferentes características, mesmo assim mantêm resultados como a erradicação da população de *S. aureus* em solução apenas com SDT. Resultados mostraram otimismo quanto ao avanço dos testes em células microbiológicas, proporcionando assim uma promessa de que com tempo e mais trabalhos na área, seja possível consolidar tais tratamentos como métodos alternativos no tratamento de doenças infecciosas na clínica.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Resistência Bacteriana e Biofilme

Observada pela primeira vez por Alexander Fleming na década de 20, a penicilina abre um horizonte de pesquisas na ciência em geral. Isolada do fungo *Penicillium notatum*, essa molécula marcava então o início da era de uma das maiores descobertas da humanidade na área da saúde, a era dos antibióticos.¹

Antibióticos são moléculas cuja função consiste em matar bactérias, bem como inibir ou dificultar seu crescimento (CDC, 2019). O impacto dessa descoberta foi tão grande que estima-se, até 2018, cerca de 200 milhões de vidas salvas devido a esse avanço, perdendo apenas para as vacinas (1 bilhão) na área de farmacologia, em números brutos.²

Devido às necessidades da época, entre 1950 e 1960, metade de todos os antibióticos utilizados atualmente são descobertos, período compreendido como “*the golden age of antibiotics*”, porém pouco tempo após tais descobertas já é possível notar a mudança no perfil

de bactérias patogênicas espalhadas ao redor do planeta, evidenciando cada vez mais a dificuldade de inativação dos antibióticos, definindo a resistência antimicrobiana.³

Bactérias possuem metabolismo próprio, além de algumas propriedades e estruturas diferentes comparadas com células eucarióticas. Portanto, antibióticos e biocidas apresentam diversos mecanismos de ação diferentes entre si.⁴ Juntamente a esse fato ocorre a denominada resistência microbiana, que por definição é a capacidade de um germe de estar hábil a derrotar uma droga designada a matá-lo (CDC, 2020). Multirresistência é quando uma bactéria apresenta múltiplos mecanismos de resistência.⁵

A *Pseudomonas aeruginosa* faz parte do grupo ESKAPE, definido em 2017 pela Organização Mundial da Saúde como um grupo de bactérias que se apresentam (ou tendem a se apresentar) como multirresistentes ou são fáceis de se adquirir genes de resistência de outras linhagens.⁶ Um dos principais mecanismos de resistência como barreira física encontrado em microorganismos é o biofilme. O biofilme é sustentado por uma matriz que envolve as células imobilizadas, cuja composição varia de acordo com as linhagens ali presentes, que podem ser da mesma espécie, ou até de reinos diferentes. Essa matriz é constituída de moléculas poliméricas extracelulares, que podem ser carboidratos, lipídeos, proteínas e associações entre eles.⁷ Essa configuração de sustentação e proteção que o biofilme proporciona às células ali presentes diminui a permeabilidade de diversas substâncias químicas por meio da difusão, que já é dificultada em bactérias com outros perfis de resistência, principalmente aos fármacos. Além disso, células do sistema imunológico não são capazes de reconhecer os patógenos que estão totalmente envolvidos pela matriz, sem nenhuma parte reconhecível viável.⁸

Terapias alternativas emergem como possíveis soluções para os mais diversos problemas que os métodos tradicionais apresentam na medicina, sendo uma delas a Terapia Fotodinâmica (PDT), Sonodinâmica (SDT) e Sonofotodinâmica (SPDT) buscando contornar o problema da resistência bacteriana.^{9,10} A utilização da luz e do ultrassom, princípio das terapias acima citadas, na medicina é amplamente estudado, utilizado e consolidado há décadas, abrangendo duas grandes áreas como a ultrassonografia e a laserterapia. O princípio é o mesmo para ambas, um emissor de energia propaga ondas eletromagnéticas (luz) e sonoras (ultrassom), que ao incidir no material biológico de interesse excita moléculas alvos que podem desempenhar diversas funções ou promove fenômenos físicos controlados como a cavitação. Sonofotodinâmica (SPDT) é a associação da ação fotodinâmica e sonodinâmica, buscando aumentar a eficiência de ambas através de um efeito combinado.¹¹

1.2. Terapia Fotodinâmica (PDT)

A PDT alia efeitos fotoquímicos e fotofísicos para induzir morte celular, que pode ser via apoptose ou necrose. Sua primeira etapa é a escolha do fotossensibilizador (FS). Há diversos tipos de FS e a característica intrínseca à cada fotossensibilizador mais importante na PDT é seu espectro de absorbância, ou seja, dado um feixe de luz em um intervalo de comprimentos de onda, em quais deles há absorção ou transparência dessa molécula. Moléculas absorvem em determinados comprimentos de onda específicos da luz, caracterizando não só sua assinatura, como o intervalo no qual ela se encontra mais excitada e propensa a realizar os efeitos dinâmicos necessários para a PDT.¹² Determinado o espectro de absorção, é possível definir seu comprimento de onda de excitação.

Eventos de reflexão, absorção, espalhamento e transmissão determinam a atenuação do feixe de luz e estão diretamente relacionados à propriedades como características químicas do meio, densidade celular e tecidual, comprimento de onda incidente, metabolismo celular, dentre outros fatores. Por mais que possam não ser FS, diferentes moléculas apresentam diferentes espectros de absorção, o que significa uma transferência de energia do feixe incidente, consequentemente uma atenuação da onda transmitida. Além disso, devido à troca de interfaces entre células, tecidos e organelas, ocorrem reflexões. Um evento de espalhamento pode ser associado à cada molécula, uma vez que mesmo moléculas absorvedoras em dado comprimento de onda, dependendo do ângulo de incidência, não são capazes de receber tal energia, apenas espalhando-a.¹³

As reações que ocorrem da interação entre a luz e os fotossensibilizadores podem ser descritas através do diagrama de Jablonski, cuja imagem pode ser visualizada da figura 1. A primeira característica observada são os níveis excitados que uma molécula pode adquirir (S_0 , S_1 , S_2 , ...). Tais níveis possuem bandas de estados energéticos correspondentes a vibrações moleculares que, por via de regra, rapidamente são retornados ao estado excitado mais baixo através de reações não radiativas, como relaxação térmica. É característico de FS estarem em seu estado singuleto quando não excitados. O decaimento entre um estado excitado e outro pode ocorrer, resultando na emissão de um fóton referente à diferença de energia envolvida no decaimento e constitui o espectro de emissão de uma determinada molécula, que independe para quais estados excitados essa molécula foi levada, emitindo apenas a partir do estado S_1 para o S_0 . Uma vez excitada, para promover esse decaimento, o FS pode seguir duas reações distintas. A reação de tipo 1 envolve a transferência de carga eletrônica para espécies reativas de oxigênio, formando os radicais livres (ROS) capazes de oxidar de forma agressiva diversas biomoléculas. A reação de tipo 2 ocorre quando o FS decai de um estado

singleto para um triplexo, realizando um cruzamento intersistemas, que por sua vez transfere energia para o oxigênio molecular através de *quenching*, naturalmente existente em estado triplexo, que se excita ao estado singleto altamente reativo, consequentemente destruidor em ambientes biológicos, como os ROS. Tais espécies altamente reativas possuem um decaimento rápido, o que proporciona uma destruição localizada e apenas durante a incidência do comprimento de onda de excitação, garantindo a segurança e especificidade da PDT. Por fim, há o evento em que o próprio oxigênio molecular excitado passa a degradar o FS, conhecido como *photobleaching*, evento observado principalmente ao utilizar altas concentrações de FS.¹⁴

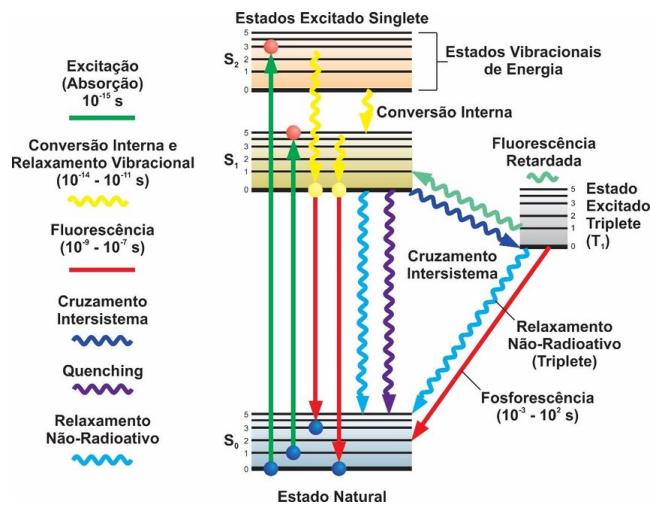


Figura 1 - Diagrama de Jablonski para a fluorescência e fosforescência retardada. Fonte: Teramoto, E. H.

Devido à heterogeneidade do ambiente celular e histológico é possível observar que mesmo dentro dos comprimentos de onda relativos à PDT (ultravioleta, visível e infravermelho), a atenuação da luz é diferente para cada comprimento de onda e acentuada na forma de que maiores comprimentos de ondas dentro do espectro da luz visível atinge maiores profundidades de tecidos, porém ainda assim não ultrapassando a hipoderme. Essa questão limita a PDT e sua eficiência em alvos que estejam além desses limites, que variam de 0 a 5 mm de profundidade.¹⁵ Um parâmetro importante a se controlar na PDT é a dose de luz entregue, que pode ser calculada multiplicando a potência do aparelho de iluminação pelo tempo de irradiação na amostra ($D = P \cdot t$)(1).

1.3. Terapia Sonodinâmica (SDT)

O som é uma onda mecânica e depende de um meio para se propagar. Uma vez excitadas, moléculas vizinhas vão propagando esse impulso até o alvo através de vibrações translacionais e longitudinais. Uma onda mecânica capaz de se propagar em meios sólidos

são denominadas elásticas, enquanto àquelas capazes de propagar em fluídos são as acústicas. Há diversos parâmetros que caracterizam uma onda de som, porém os mais importantes para o presente trabalho são a sua frequência, intensidade, comprimento de onda e velocidade de propagação, que varia a depender do meio. Ultrassom está associado à ondas de som com frequência acima de 16 KHz, superior ao limite pelo qual os seres humanos são capazes de escutar e seus efeitos biológicos são muito importantes, como é o caso da imagem por ecografia, sonotrombólise, imunoterapia, entre outras.¹⁶

O ultrassom pode ser gerado de diferentes formas, como por exemplo através de métodos mecânicos, ópticos, térmicos e eletromagnético (efeito piezoelétrico). A onda mecânica utilizada no presente trabalho é gerada a partir da conversão da corrente elétrica pelo efeito piezoelétrico de um transdutor. Como descrito por Wanja Gao, o ultrassom possui zonas cuja entrega de potência acústica varia entre máximos e mínimos, se dividindo entre *near field* e *far field*¹⁷, como apresentado na figura 2. A distância, a partir do transdutor, em que acaba o *near field* e inicia o *far field* é descrita pela equação (2), que segundo a literatura, pode representar um ponto de maior entrega de potência do feixe de ultrassom.

$$N = \frac{D^2}{4\lambda} = \frac{D^2 f}{4v} \quad (2)$$

D = Diâmetro do transdutor;

λ = Comprimento de onda do ultrassom;

f = Frequência do ultrassom;

v = Velocidade do som no meio de propagação

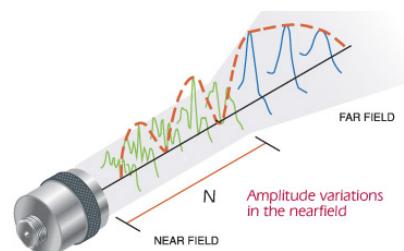


Figura 2 - Características do feixe de ultrassom com ênfase no *near field* e *far field*.. Fonte: Olympus IMS.

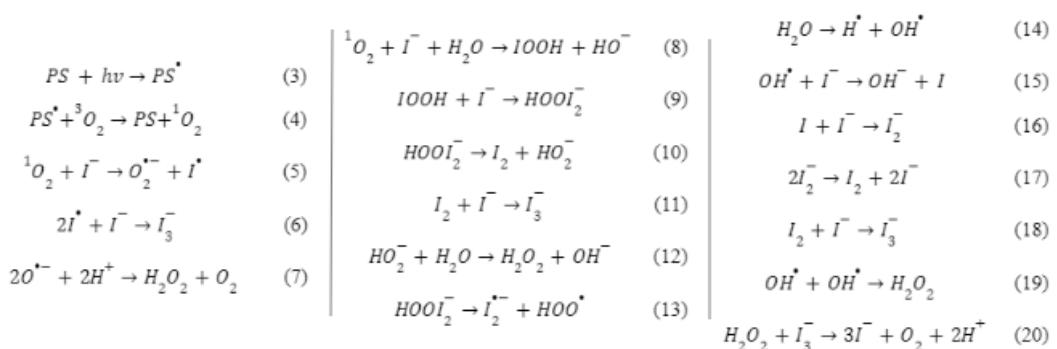
Em ensaios *in vitro* há quatro modos de aplicação do ultrassom na amostra que são mais descritos na literatura, como o transdutor direto na placa de tratamento, o transdutor submerso em um fluido e a placa de tratamento no topo, o transdutor e a placa (selada) submersos no fluido e o transdutor mergulhado diretamente no meio de tratamento com a placa aberta. Cada arranjo possui suas vantagens, enquanto aqueles que são mais rápidos, fáceis e baratos para ensaios antimicrobianos são o transdutor-placa e transdutor-fluido-placa.¹⁸

Uma onda mecânica, assim como a eletromagnética, carrega energia e pode transferi-la à moléculas que são capazes de absorvê-la, no caso os sonossensibilizadores, porém a capacidade do ultrassom de deformar o meio em que se propaga constitui uma importante ação biológica, como é o caso da cavitação que está diretamente relacionada à capacidade elástica dos materiais e é proporcional à sua tensão de cisalhamento. A cavitação

ocorre quando a pressão negativa exercida pelas ondas longitudinais à propagação do som, devido à resistência intrínseca dos materiais, supera tal capacidade de resistir do meio, com isso bolhas surgem, se expandem e colapsam criando um microambiente altamente energético e quente.¹⁶ Essas cavitações, além da capacidade de transferência de energia, quando em material biológico podem afetar a permeabilidade da membrana, promover a abertura de poros, lise de cadeias protéicas, bem como romper células. Em específico no biofilme, estudos mostram que SDT com microbolhas, ancoradas ou não à fármacos, são associados principalmente a eventos de sonoporação e dispersão, atuando principalmente na destruição de filamentos proteicos da matriz extracelular, o que resulta em uma remoção mecânica de células e não aumentando fatores de virulência, portanto junto à isso associa-se à SDT uma maior permeabilidade de fármacos no meio intracelular.

1.4. Iodeto de Potássio como potencializador no controle microbiológico

Diversas moléculas, como sais inorgânicos, potencializam reações químicas já estimuladas antes pela PDT e SDT, bem como adicionam vias capazes de acentuar essa transferência energética, criando ainda mais radicais em solução. Na PDT, Hamblim mostra que diversos sais inorgânicos são capazes de potencializar a ação do tratamento em até 6 logs de redução de unidades formadoras de colônias (UFC), com o iodeto de potássio (KI) apresentando os melhores resultados. Como descrito anteriormente, os FS são capazes de transferir a energia recebida por duas vias diferentes, nesse caso com ênfase à via do tipo 2, quando o oxigênio molecular em estado excitado encontra excesso de iodo em solução, há também duas possibilidades de transferência de energia. A primeira envolve a transferência eletrônica do ânion iodeto ao oxigênio em seu estado excitado, que estimulará a produção de peróxido de hidrogênio enquanto o iodeto reage com outras espécies formando radicais de iodo de vida curta, que são extremamente citotóxicos.¹⁹ Reações (3) a (7).



A segunda possível reação é termodinamicamente mais favorável que a anterior, com a mesma produção de radicais de iodo e peróxido de hidrogênio citotóxicos, porém através da formação de peroxiodeto cujas reações são apresentadas de (8) a (13).

Ao tratamento com ultrassom, Morison mostra que o iodo é um bom quantificador de cavitação proveniente do ultrassom por sua alta capacidade de interagir com espécies energéticas geradas a partir da transferência de energia com o colapso das bolhas de cavitação. A reação citada é denominada de *Weissler Reaction* em homenagem ao seu descobridor e é bastante conhecida desde o século passado, cuja descrição apresenta como é formada as espécies de iodo a partir dos eventos de cavitação, como mostra (14) a (20).

A cavitação é capaz de criar um ambiente extremamente quente e energético nos locais espacialmente próximos ao seu fenômeno, que é capaz de formar radicais hidroxila energéticos e ao encontrar ânions iodeto livre em solução reagem na forma de retirar um elétron e estimular a reação (16) em um ambiente com excesso de íons iodeto. Uma vez formado o iodo molecular, estimula a via de formação do íon triiodeto (reação 18), com alta ação citotóxica. Além disso, radicais hidroxila são capazes de interagir entre si formando peróxido de hidrogênio e, quando em solução alcalina ou neutra, reagem com o íon triiodeto liberando íons iodeto em solução e acidificando o meio localmente (reações 19 e 20).²⁰

1.5. Terapia Sonofotodinâmica (SPDT)

A SPDT busca aliar todos os benefícios da PDT e SDT, bem como a adição de sais inorgânicos e a acentuação da formação de radicais livres capazes de melhorar cada vez mais o sinergismo das terapias. Com duas fontes de energia, há a possibilidade de atingir tecidos que apenas a PDT não é capaz, bem como desagregar moléculas através da ação mecânica do ultrassom, auxiliar na dispersão da matriz do biofilme bacteriano, além de todos os outros benefícios já citados. O desafio é encontrar os melhores parâmetros para ambas as entregas de energia, bem como a forma de aplicação, uma vez que o ultrassom é extremamente dependente do meio de propagação e de suas propriedades elásticas. Outro desafio consiste em focalizar as duas fontes de forma a entregar seu máximo de potência de luz e pressão no mesmo ponto espacial. O pré-tratamento com uma das terapias, para a posterior aplicação de outra, que pode não ser necessariamente a PDT ou SDT, também entra em pauta. O presente trabalho buscou maximizar os parâmetros aqui descritos, desenvolver um método simples, rápido e eficiente para testes *in vitro* para a SPDT, e assim, caracterizar a redução microbiana do biofilme de *P. aeruginosa* com diferentes arranjos experimentais descritos na literatura.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral é a caracterização da redução microbiana em biofilme de *P. aeruginosa* mediada por curcumina com diferentes arranjos, bem como variando parâmetros. Para isso, dois arranjos foram utilizados: o transdutor-placa e o transdutor-fluido-placa. Os parâmetros alterados foram a concentração de curcumina, a intensidade de ultrassom, a concentração de sais inorgânicos, o volume do fluido e a dose de luz.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagem bacteriana, pré-inóculo e inóculo

A cepa bacteriana utilizada no presente estudo foi a *P. aeruginosa* ATCC 27853, estocada a -80 °C na razão de 1:1 em glicerol em tubos criogênicos. Para utilização nos ensaios, uma alíquota do glicerinado foi inoculado em placas de Petri 90x15 mm (Greiner Bio-One) em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) 1,5 % ágar (Himedia) pelo método da estria por esgotamento. Tais placas foram incubadas à 37 °C *overnight*.

Para o pré-inóculo, em um tubo cônico de 15 ml, com 5 ml de meio *Tryptic Soy Broth* (TSB) (Himedia), inocula-se uma colônia isolada de *P. aeruginosa* ATCC 27853, a qual é incubada à 37 °C *overnight*.

O inóculo é obtido através da fase *log* da bactéria em pré-inóculo do dia anterior. Para isso, é inoculado meio TSB e o pré-inóculo na proporção de 19:1 com um limite máximo de 30 % do volume do tubo cônico utilizado e aguarda-se 3h30min até atingir a fase *midlog*.

3.2. Formação, adesão, crescimento e lavagem do biofilme

Com o inóculo na fase pretendida, é possível formar o biofilme para posterior tratamento. O crescimento dos biofilmes no presente trabalho foi em placas de 96 poços de fundo chato (KASVI) e em placas de Petri (KASVI) 60x15 mm com a mesma técnica utilizada em ambas.

O inóculo em fase *log* é submetido a diluições em meio TSB até sua densidade ótica medida em espectrofotômetro (Varian) à 600 nm atinja 0,18 u.a.. Em placas de Petri 60x15 mm foi inoculado 1 ml de bactéria ajustada de forma que cubra a base da placa em sua totalidade. Em placas de 96 poços, 200 µl foram inoculados em cada poço. Tais placas foram incubadas à 37 °C e 150 rpm por 90 minutos, compreendendo a fase de adesão.

Com a adesão estabelecida, a lavagem do biofilme é realizada 2 vezes com solução de NaCl 0,8 % p/v, de forma a agredir quanto menos possível o biofilme aderido ao fundo da placa. Ao final do procedimento, coloca-se meio TSB e incuba-se por 24 horas à 37 °C e 150

rpm. No dia seguinte há a retirada do conteúdo das placas para a inoculação de um meio TSB novo e então uma nova incubação à 37 °C a 150 rpm para formar um biofilme maduro de 48 horas.

3.3. Curcumina, SDS e KI

A solução incubada junto ao biofilme é composta de um agente fotossensibilizador, a curcumina, um surfactante aniónico, o SDS e um sal inorgânico, o KI.

Foi utilizada a curcumina sintética (PDT Pharma) como fotossensibilizador, que para os ensaios realizados no presente trabalho, foi preparada uma solução estoque em dimetilsulfóxido (DMSO) à 160 mM em um balão volumétrico de 10 ml. Em um tubo côncico de 10 ml é adicionado 0,320 g de KI, 0,01 g de SDS (0,1 %) e solução de NaCl 0,8 % junto à solução estoque de curcumina com o intuito de obter as concentrações necessárias para os testes, sempre totalizando um volume de 10 ml de solução final.

3.4. Fontes de energia. Luz e Ultrassom

3.4.1. Ultrassom

Como fonte de energia sonora, foram utilizados 2 tipos diferentes de transdutores e arranjos experimentais. O primeiro comprehende um sistema pelo qual o transdutor é colocado em contato direto com a placa que contém a amostra, apenas com um gel na interface transdutor-placa para aumentar o contato com o transdutor. O segundo arranjo é um sistema pelo qual o transdutor é banhado a um fluido que proporciona um posicionamento da amostra a uma distância significativa da fonte emissora, aumentando a interface transdutor-fluido-amostra.

3.4.2. Arranjo transdutor-placa

O aparelho de ultrassom utilizado foi o Sonomed IV (Carcí) de 1 MHz e transdutor com ERA de 3,6 cm². O transdutor foi posicionado embaixo da amostra com um película do gel clínico (RMC) como interface para garantir o contato do transdutor piezoelétrico e da placa. Nesse arranjo apenas placas de Petri de 60x15 mm foram utilizadas. Com isso, a fonte de luz foi posicionada de forma inversa à do transdutor. Apenas o modo pulsado à 100 Hz do ultrassom foi utilizado nesse arranjo, com ciclo de trabalho de 20%. As medidas de potência dos aparelhos de ultrassom foram acompanhadas através de medidas via balança Ultrasound Power Meter UPM-G2 (GluttyMax).

A fonte de luz utilizada foi a *Biotable*, um equipamento que possui 96 LED's com potência de aproximadamente 40 mW/cm^2 e a dose entregue foi 100 J/cm^2 , portanto de acordo com (1) o tempo de tratamento foi de 42 minutos.

3.4.3. Arranjo transdutor-fluido-placa

No decorrer das atividades foi observado a necessidade do desenvolvimento de um protótipo capaz de suportar o transdutor embaixo da amostra, banhado a um fluido, a fonte de luz em cima e a amostra no ponto focal entre as duas fontes. Portanto, junto à oficina do Instituto de Física de São Carlos, o presente trabalho propôs desenvolver a *Aquatable*, de acordo com o projeto apresentado na figura 8. A ideia base para seu desenvolvimento parte desse projeto, visto que é um modo simples, rápido e barato para avançar os estudos envolvendo o ultrassom para os testes *in vitro* aqui necessários.

O desenvolvimento da *Aquatable* foi baseado nas dimensões do aparelho de ultrassom Recupero (MMOptics). Há 2 possibilidades de transdutores para esse arranjo, o de transdutor piezoelétrico uniforme e o que possui um LED adaptado no meio do transdutor, sendo escolhido no presente trabalho a segunda opção com o LED desligado. A configuração escolhida foi 1 MHz de frequência, modo contínuo e água destilada como fluido.

A fonte de luz utilizada nesse experimento foi o Área Grande, um aparelho com LED's distribuídos de forma homogênea capaz de iluminar a placa de tratamento e entregar aproximadamente 30 mW/cm^2 de potência de luz, variando consideravelmente esse valor em pequenas variações de distância da amostra, portanto para entregar uma dose de 100 J/cm^2 o tempo de tratamento variou em cada caso, entre 42 e 60 minutos.

3.5. Método de avaliação dos tratamentos

O método utilizado para quantificar a eficiência dos tratamentos foi o de contagem de colônias através da microgota. Ao final do tratamento, todos os grupos eram raspados com uma ponteira estéril de pipeta em 3 direções distintas e $200 \mu\text{L}$ eram transferidas para uma placa de multipoços para realizar 5 diluições seriadas na razão de 1:10, totalizando 6 poços, os quais eram inoculados em um volume de $10 \mu\text{L}$ na placa de BHI Ágar. Incubou-se à 37°C por 24 horas e quantificou-se o número de colônias isoladas de cada diluição, que, através da relação abaixo, foi possível construir gráficos mono-*Log* para melhor visualização da eficácia do tratamento. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle. Os ensaios foram realizados em duplicatas e o erro considerado é o desvio padrão entre as amostras. O software utilizado para elaboração dos gráficos foi o GraphPad Prism 9.

3.6. Grupos de tratamento

Os grupos de tratamento do presente trabalho são o controle, sem incidência de luz e ultrassom; o PDT, que há incidência de luz; o SDT, que há incidência de ultrassom; e o SPDT, que há incidência de luz e ultrassom simultaneamente. Todos os grupos foram realizados com e sem a presença de FS.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Arranjo transdutor-placa

Em uma triagem inicial, foi procurado obter a capacidade de redução de biofilme de *P. aeruginosa* da curcumina sem iluminação ou estimulação por ultrassom, portanto sem elevá-la ao seu estado excitado. Como esperado, a curcumina é inerte e não apresentou capacidade inibitória ou estimulatória. Isso proporciona a comparação entre os grupos PDT, SDT e SPDT, bem como seus grupos controle. A figura 4 mostra os primeiros resultados de ajuste dos parâmetros para potencializar a ação da SPDT.

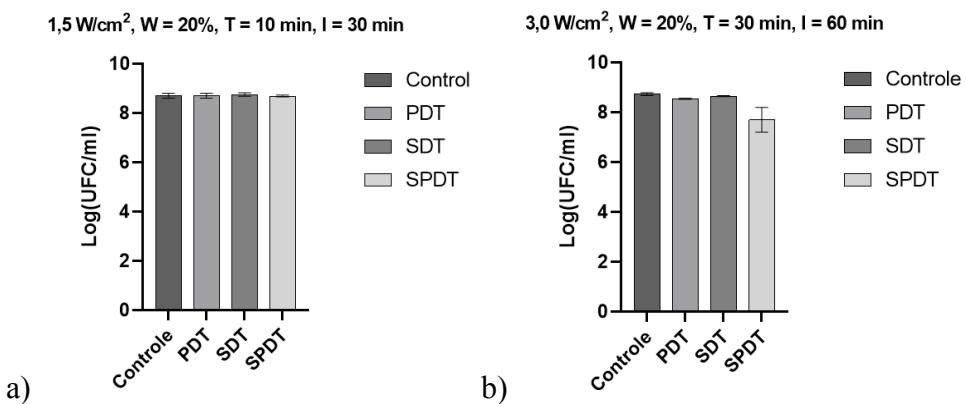


Figura 3 - a) Tratamento do biofilme de *P. aeruginosa* na configuração transdutor-placa com ultrassom de intensidade de 1,5 W/cm², no modo pulsado a 100Hz com ciclo de 20% de trabalho, tempo de tratamento igual a 10 min e incubação de 30 min, [Cur]=80µM e SDS a 0,1%; b) Tratamento do biofilme de *P. aeruginosa* na configuração transdutor-placa com ultrassom de intensidade de 3,0 W/cm², no modo pulsado a 100Hz com ciclo de 20% de trabalho, tempo de tratamento igual a 30 min e incubação de 60 min, [Cur]=80µM e SDS a 0,1%.

Note que os parâmetros que se alteram entre os grupos de tratamento apresentados na figura 3 são a intensidade do ultrassom e os tempos de tratamento e incubação. Resultados de microscopia confocal realizada por Fernanda Alves²¹, pós-doutoranda do Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica mostram uma ótima absorção de curcumina para biofilme bacteriano com 60 minutos de incubação, portanto a partir desses resultados congruentes, tal parâmetro foi fixado para os testes seguintes.

Posteriormente, foi alterada a concentração de curcumina e o tempo de tratamento, bem como já foi introduzido o iodeto de potássio. Tais resultados se apresentam na figura 4, que mostra um aumento da efetividade dos tratamentos de PDT e SDT em relação aos resultados obtidos anteriormente, mesmo sem o sal inorgânico. Além disso, ao adicionar o KI, os dois tratamentos se mostram mais efetivos com um destaque maior ao SDT, que foi capaz de reduzir 1 *log* de UFC/ml a mais.

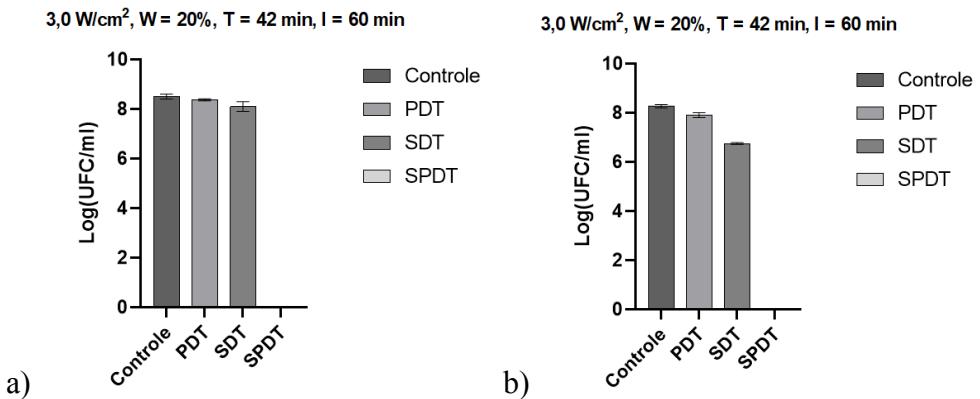


Figura 4 - a) Tratamento do biofilme de *P. aeruginosa* na configuração transdutor-placa com ultrassom de intensidade de 3,0 W/cm², no modo pulsado a 100Hz com ciclo de 20% de trabalho, tempo de tratamento igual a 42 min e incubação de 60 min, [Cur]=120µM, SDS a 0,1%; b) Tratamento do biofilme de *P. aeruginosa* na configuração transdutor-placa com ultrassom de intensidade de 3,0 W/cm², no modo pulsado a 100Hz com ciclo de 20% de trabalho, tempo de tratamento igual a 30 min e incubação de 60 min, [Cur]=120µM e SDS a 0,1% e [KI]=200mM.

Como apresentado, nesses parâmetros a SPDT foi capaz de erradicar colônias formadoras de biofilme. Tais resultados foram confirmados por triplicatas. A partir daí, fixou-se a dose de luz entregue em 100 J/cm², e buscou entender a influência apenas do ultrassom na morte celular, bem como a variação da concentração de curcumina para encontrar a concentração ótima. Também buscou rastrear a influência apenas das fontes de energia no biofilme, visto que apenas o ultrassom já pode proporcionar efeitos mecânicos e a luz efeitos oxidativos estressantes às células.

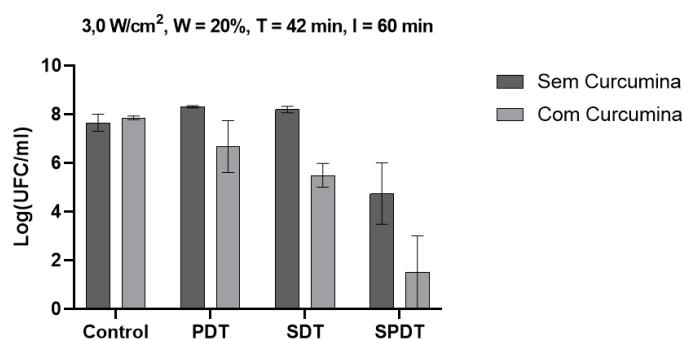


Figura 5 - Comparação dos grupos tratamento do biofilme de *P. aeruginosa* com e sem fotossensibilizador na configuração transdutor-placa com ultrassom de intensidade de 3,0 W/cm², no modo pulsado a 100Hz com ciclo de 20% de trabalho, tempo de tratamento igual a 42 min e incubação de 60 min, [Cur]=120µM, SDS a 0,1% e [KI]=200mM.

A figura 5 sustenta a hipótese de que há necessidade de um sensibilizador capaz de acentuar a morte celular como descrito previamente, bem como mostra que para essa metodologia, nenhum efeito das ondas eletromagnéticas e ultrassônicas sozinhas é visto, porém quando aliadas é capaz de reduzir 3 logs de UFC/ml mesmo sem fotossensibilizador. A temperatura de tratamento foi monitorada e nos casos em que há a utilização do ultrassom variou entre 36°C e 40°C na placa e no meio de tratamento. A hipótese de que apenas o ultrassom e a luz podem ser tóxicas à células e ao biofilme bacteriano é sustentada, uma vez que efeitos físicos de cavitação podem variar a permeabilidade da membrana celular, lisar células e dispersar biofilme, a energia cedida pela luz e pelas bolhas de alta energia já podem produzir radicais oxidativos, mesmo que em baixa concentração, mas que em um longo tempo de exposição pode ser capaz de diminuir a população bacteriana. Por fim, a comparação ao adicionar o fotossensibilizador mostra a maior eficiência dos tratamentos, evidenciando a potencialização de todos os efeitos citados.

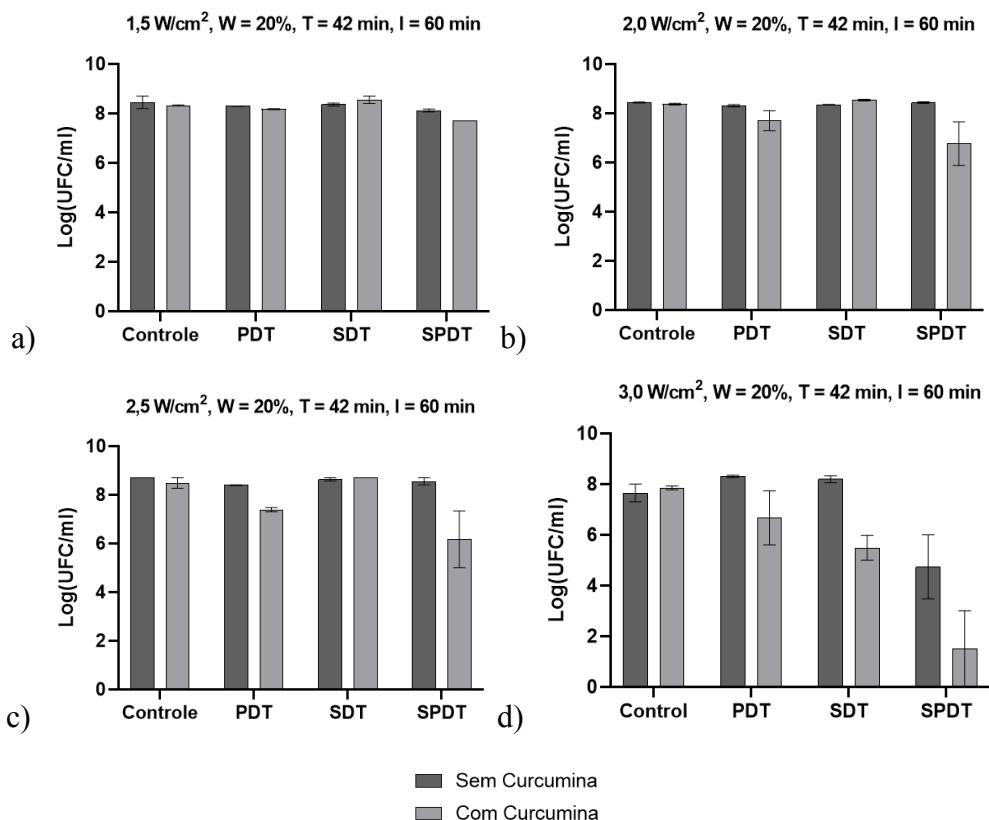


Figura 6 - Comparação dos grupos tratamento do biofilme de *P. aeruginosa* com e sem fotossensibilizador na configuração transdutor-placa com ultrassom de intensidade de a) 1,5 W/cm²; b) 2,0 W/cm²; c) 2,5 W/cm² e d) 3,0 W/cm²; no modo pulsado a 100Hz com ciclo de 20% de trabalho, tempo de tratamento igual a 42 min e incubação de 60 min, [Cur]=120µM, SDS a 0,1% e [KI]=200mM.

Ao diminuir parâmetros de intensidade do ultrassom é possível observar a perda de eficiência do tratamento, como esperado, uma vez que há uma menor energia sendo inserida ao sistema. Vale ressaltar que um tratamento que reduz 3 *logs* de população bacteriana corresponde a uma eficácia de 99,9% em relação ao controle e é considerado um resultado significante. Nesses parâmetros só é possível obter na maior intensidade de ultrassom testada e no grupo SPDT.

A figura 7 mostra o comportamento dos tratamentos com a variação da concentração de curcumina. Como relatado pela literatura, concentrações elevadas de curcumina podem agregar entre si e diminuir a eficiência do tratamento, o que pode até ser observado nos grupos PDT e SDT sozinhos, porém a eficiência da SPDT aumenta com o aumento da concentração de curcumina, o que pode indicar o sinergismo do ultrassom e da luz também no momento de desagregar moléculas, com a ação mecânica do ultrassom, sempre mantendo o meio o mais concentrado possível com fotossensibilizador.

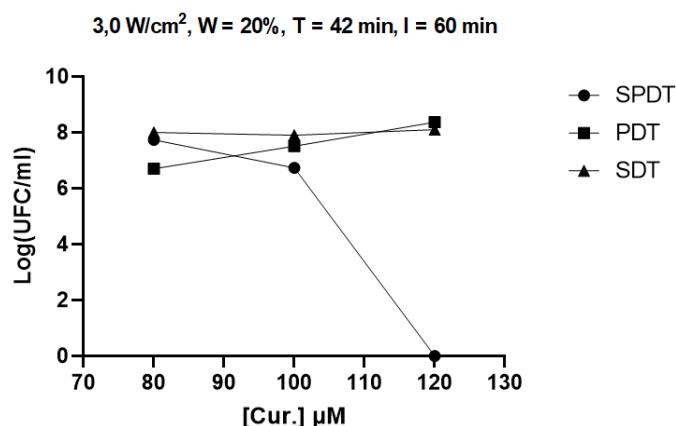


Figura 7 - Comparação dos grupos tratamento do biofilme de *P. aeruginosa* com diferentes concentrações de curcumina na configuração transdutor-placa com ultrassom de intensidade de 3,0 W/cm²; no modo pulsado a 100Hz com ciclo de 20% de trabalho, tempo de tratamento igual a 42 min e incubação de 60 min, SDS a 0,1% e [KI]=200mM.

4.2. Arranjo transdutor-fluido-placa

Com a finalidade de comparar os resultados obtidos na configuração transdutor-placa, foi desenvolvido, por meio do presente trabalho, um protótipo denominado *Aquatable* para o Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CEPOF) em conjunto com seu Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT). Espera-se que esse desenvolvimento seja útil em caracterizar aparelhos de ultrassom, realizar testes *in vitro* e ainda sofra adaptações para suportar ensaios *in vivo*, abrangendo diversos trabalhos em execução no CEPOF.

Primeiramente, através da equação 2, foi encontrado o *near field* dos transdutores presentes em laboratório, uma vez que o objetivo é encontrar uma relação da altura do fluido entre o transdutor e a amostra com sua efetividade no tratamento. Verificou-se a necessidade

da construção de um equipamento com cerca de 15 centímetros de altura e base com tamanho para, no mínimo, suportar o transdutor do Recupero. O material escolhido foi o vidro e o encaixe deveria ser feito de forma a vedar o fluxo de qualquer fluido, visto que o transdutor deve se posicionar por baixo da placa e ficar submerso. Por fim foi desenvolvido um regulador de altura para o posicionamento da placa. As imagens do projeto e da realização, já com as fontes de luz e ultrassom, podem ser observadas na figura 8.

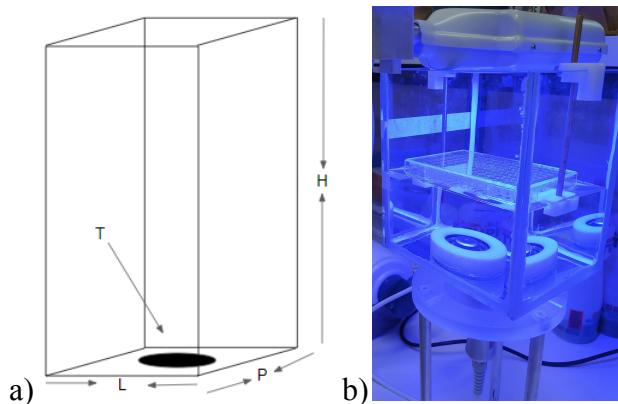


Figura 8 - a) Projeto da *Aquatable*, com $h \approx 15\text{cm}$, $L \approx 10\text{cm}$ e $P \approx 10\text{cm}$; b) *Aquatable* montada com o transdutor posicionado embaixo e o Área Grande por cima, entre eles a placa de tratamento com água mili-Q à uma altura de 5,5cm.

A partir do desenvolvimento da *Aquatable*, há a necessidade de realizar os mesmos ensaios para o arranjo transdutor-fluido-placa. Os aparelhos utilizados foram modificados, o ultrassom alcança um limite de $1,0 \text{ W/cm}^2$ de potência de luz, enquanto para as alturas desejadas, o Área Grande precisa de 60 minutos de tratamento para entregar a mesma dose que a *Biotable* entrega com 42 minutos, de acordo com a equação 1. Com foco na parte do ultrassom, definiu-se a dose de luz fixa em 100 J/cm^2 (portanto tempo de tratamento de 60 minutos para o Área Grande e buscou-se variar o volume de água destilada, a concentração de curcumina. A decisão de manter o tempo de incubação e a utilização de KI baseia-se nos resultados obtidos previamente.

De acordo com a equação 2, o *near field* do transdutor utilizado é de 5,5 cm, o que sugere uma maior entrega de potência acústica quando a amostra se encontra a essa distância do transdutor, portanto foram testadas duas alturas diferentes da coluna de água, sendo elas 5,5cm e 10,5cm. Todos os demais parâmetros foram fixados para ênfase nessa questão, fixou-se a potência do ultrassom em $1,0 \text{ W/cm}^2$, modo contínuo, 100 J/cm^2 de dose de luz, 60 minutos de incubação, 60 minutos de tratamento, 0,1% de SDS e $[\text{KI}] = 200\text{mM}$. Todos os ensaios envolvendo a *Aquatable* foram realizados com 4 concentrações de curcumina, sendo elas 80,100,120 e 140 μM . Nenhuma redução em relação ao controle foi observada em nenhum dos casos, sugerindo uma revisitação na teoria para continuar os ensaios com

biofilme. Vale ressaltar que, mesmo entregando a mesma dose de luz que a configuração transdutor-placa, a potência do ultrassom máxima nesse caso é de $1,0 \text{ W/cm}^2$, o qual está sendo estudado para aumento de potência para trabalhos futuros.

Para tentar uma caracterização de forma mais simples e rápida da *Aquatable*, foram utilizados os mesmos princípios citados anteriormente e a mesma metodologia, porém para outra linhagem bacteriana, o *S. aureus* ATCC25923, em suspensão e não mais em biofilme. Resultados preliminares obtidos por Fernanda Alves²¹ indicam uma maior susceptibilidade à PDT e SDT de *S. aureus* em relação às bactérias Gram-negativas, bem como sua utilização em suspensão diminui um fator de resistência, a barreira física proporcionada pelo biofilme. A figura 9 mostra os resultados obtidos nos ensaios com *S. aureus*.

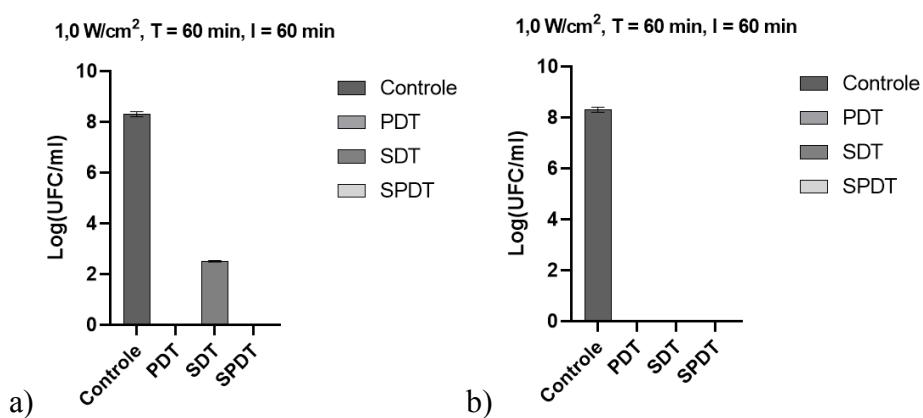


Figura 9 - Comparação dos grupos tratamento de suspensão de *S. aureus* na configuração transdutor-fluido-placa a 5,5cm de altura, com ultrassom de intensidade de $1,0 \text{ W/cm}^2$ no modo contínuo, tempo de tratamento igual a 60 min e incubação de 60 min, SDS a 0,1%, $[\text{KI}] = 200\text{mM}$ e a) $[\text{Cur}] = 80\mu\text{M}$; b) Resultados representativos quando a curcumina foi utilizada nas concentrações de $[\text{Cur}] = 100\mu\text{M}$, $120\mu\text{M}$ e $140\mu\text{M}$ (os resultados foram semelhantes).

Como pode-se observar, houve erradicação total da população bacteriana na maioria dos tratamentos, exceto no grupo cuja concentração de curcumina era igual a $80\mu\text{M}$, que mesmo não erradicando foi ínfima em relação ao controle. Para encontrar a relação entre PDT e SDT na SPDT não pode haver erradicação total de ambos os tratamentos, uma vez que não há como rastrear essa alta eficiência da terapia. Com isso buscou-se diminuir o tempo de tratamento, por consequência a dose de luz entregue, para 20 minutos, o qual os resultados encontram-se na figura 10.

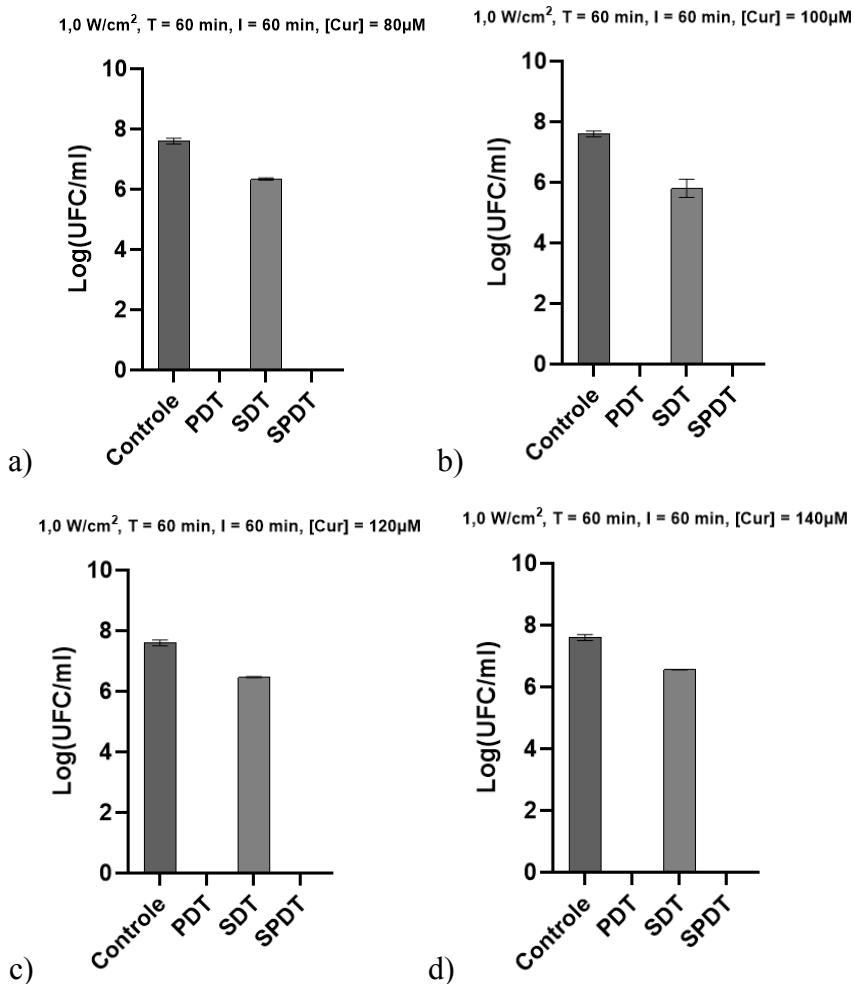


Figura 10 - Comparação dos grupos tratamento de suspensão de *S. aureus* na configuração transdutor-fluido-placa a 5,5cm de altura, com ultrassom de intensidade de 1,0 W/cm² no modo contínuo, tempo de tratamento igual a 20 min e incubação de 60 min, SDS a 0,1%, [KI]=200mM e a) [Cur]=80µM; b) [Cur]=100µM, 120µM e 140µM (os resultados foram semelhantes).

É notório que apenas a PDT já é capaz de erradicar a população bacteriana em sua totalidade, portanto nenhuma conclusão acerca do sinergismo das terapias pode ser obtida com tais resultados, porém nota-se que para 20 minutos de tratamento o SDT perde quase a totalidade de sua eficiência, reduzindo em apenas 1,5 *log* no máximo e não apresentando relação com a concentração de fotossensibilizador.

Congruente com a literatura, tais resultados mostram um sinergismo entre a PDT e SDT, bem como Alves et al. demonstraram para *Candida albicans* e *S. aureus*, relatando uma maior efetividade da SPDT para inativação de ambos os microrganismos, além de um ganho de atividade quando introduzidos SDS e KI.¹¹ Em *P. aeruginosa*, Abdulrahman et al. mostram que a PDT mediada pela curcumina reduz a biomassa do biofilme através da supressão de moléculas do *quorum sensing*.²² Zhou et al. evidencia a capacidade da PDT com curcumina em inativar *P. aeruginosa* em solução, bem como cita o efeito sinérgico com a polimixina B, um antibiótico com alvo na membrana celular.²³ Liu et al. utilizou microemulsões de

curcumina contra *P. aeruginosa* através da PDT e encontrou uma maior erradicação de células quando o FS encontra-se encapsulado, diminuindo sua agregação. Mesmo que estudos com SDT e curcumina sejam uma inovação, autores como Seth et al. mostram que o ultrassom combinado com ciprofloxacina aumentou a eficiência em relação ao grupo sem US contra biofilme de *P. aeruginosa* em ensaios *in vivo*.¹¹ Por fim, Costley et al. mostra que peptídeos conjugados com sonosensibilizadores contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram capazes de reduzir 5 e 7 logs de UFC/ml, respectivamente.¹¹ Cada autor aborda o problema apresentado de uma forma, o que perde o efeito de comparação entre o presente trabalho e os aqui citados, como por exemplo a ênfase aqui dada aos diferentes arranjos não foi relatada em nenhum dos trabalhos citados anteriormente, além do fato de haver poucos trabalhos na literatura envolvendo essas terapias em microrganismos, porém os que possuem mostram uma ótima efetividade da PDT, SDT e SPDT, o que posiciona o tema em uma área promissora na medicina.

A caracterização da *Aquatable* está apenas no começo e os estudos com diferentes arranjos no tratamento com ultrassom é muito importante para determinar em cada caso qual é a maior efetividade e com quais parâmetros. O presente trabalho deixa em aberto essa parte por falta de tempo para o desenvolvimento por completo dos objetivos aqui propostos, mas ressalta a importância e a dificuldade em planejar desde o arranjo experimental, seu desenvolvimento e a caracterização, que pode levar anos para obtenção de resultados satisfatórios.

5. CONCLUSÃO

Visando o desenvolvimento e a consolidação de terapias alternativas à métodos tradicionais de tratamento, a PDT e a SDT são expoentes por apresentarem resultados sólidos em diversas áreas da medicina, como por exemplo a oncologia e a infectologia. Os resultados aqui apresentados evidenciam a sensibilidade da eficiência dos tratamentos com alguns parâmetros, bem como o meio de interface, a distância da fonte de energia e a amostra, sua dose e a concentração de sensibilizadores. Ainda assim, é possível notar resultados animadores quando os parâmetros são otimizados, evidenciando o potencial que a SPDT pode apresentar em testes *in vivo* e sua posterior consolidação clínica. Por fim, o presente trabalho dá base para a continuidade na busca por caracterizar diferentes arranjos experimentais, bem como finalizar àqueles aqui iniciados.

REFERÊNCIAS

1. Ramos, M. 'É um milagre!' Fundação Oswaldo Cruz.
2. Levine. Inventions that drive modern life expectancy. Aperion Care.
3. Davies, J. Where have all the antibiotics gone? *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 17, 287–290.
4. Ferreira, F. A. História das Bactérias. Brasil Escola.
5. LaMorte, W. Bacteria as Pathogens. Boston University.
6. Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S. & Pardesi, K. R. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Front. Microbiol.* 10, (2019).
7. Rehman, F., Thebo, K. H., Aamir, M. & Akhtar, J. Nanomembranes for water treatment. *Nanotechnol. Beverage Ind. Fundam. Appl.* 8, 207–240 (2020).
8. Tendolkar, P. M., Baghdayan, A. S., Gilmore, M. S. & Shankar, N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 72, 6032–6039 (2004).
9. Rosenthal, I., Sostaric, J. Z. & Riesz, P. Sonodynamic therapya review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* 11, 349–363 (2004).
10. Jr, J. S. M. A Review. 15, 49–68 (1999).
11. Alves, F., Ayala, E. T. P. & Pratavieira, S. Sonophotodynamic Inactivation: The power of light and ultrasound in the battle against microorganisms. *J. Photochem. Photobiol.* 7, 100039 (2021).
12. Van Nong, H. et al. Fabrication and vibration characterization of curcumin extracted from turmeric (*Curcuma longa*) rhizomes of the northern Vietnam. *Springerplus* 5, (2016).
13. Khan, R., Gul, B., Khan, S., Nisar, H. & Ahmad, I. Refractive index of biological tissues: Review, measurement techniques, and applications. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 33, 102192 (2021).
14. Off, P. N. et al. Jablonski diagram. 1–7 (2011).
15. Gupta, A., Organisation, D., Sadasivam, M., Vecchio, D. & Pam, N. Low-Level Laser (Light) Therapy. (2013).
16. Zupanc, M. et al. Effects of cavitation on different microorganisms: The current understanding of the mechanisms taking place behind the phenomenon. A review and proposals for further research. *Ultrason. Sonochem.* 57, 147–165 (2019).
17. Gao, W., Liu, W., Hu, Y. & Wang, J. Study of ultrasonic near-field region in ultrasonic liquid-level monitoring system. *Micromachines* 11, (2020).
18. Hensel, K., Mienkina, M. P. & Schmitz, G. Analysis of ultrasound fields in cell culture wells for in vitro ultrasound therapy experiments. *Ultrasound Med. Biol.* 37, 2105–2115 (2011).
19. Iodide, P. & Antimicrobial, P. crossm Potassium Iodide Potentiates Antimicrobial. 61, 1–15 (2017).
20. Morison, K. R. & Hutchinson, C. A. Limitations of the Weissler reaction as a model reaction for measuring the efficiency of hydrodynamic cavitation. *Ultrason. Sonochem.* 16, 176–183 (2009).
21. Alves, F. et al. Strategies to Improve the Antimicrobial Efficacy of Photodynamic, Sonodynamic, and Sonophotodynamic Therapies. *Lasers Surg. Med.* 53, 1113–1121 (2021).
22. Abdulrahman, H., Misba, L., Ahmad, S. & Khan, A. U. Curcumin induced photodynamic therapy mediated suppression of quorum sensing pathway of *Pseudomonas aeruginosa*: An approach to inhibit biofilm in vitro. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 30, 101645 (2020).
23. Zhou, F. et al. Enhancement of photodynamic bactericidal activity of curcumin against *Pseudomonas Aeruginosa* using polymyxin B. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 37, 102677 (2022).