

Utilização de terapia fotodinâmica e óleos essenciais no controle *In Vitro* de *Acinetobacter Baumanni* e *Pseudomonas Aeruginosa*

Use of photodynamic therapy and essential oils in the *In Vitro* control of *Acinetobacter Baumanni* and *Pseudomonas Aeruginosa*

DOI:10.34119/bjhrv6n2-099

Recebimento dos originais: 17/02/2023

Aceitação para publicação: 17/03/2023

Bruno Antunes Contrucci

Residente de Pediatria

Instituição: Hospital da Criança e Maternidade - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (HCM-FAMERP), Departamento de Pediatria, São José do Rio Preto - São Paulo
Endereço: Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, São José do Rio Preto - São Paulo, CEP: 15090-000

E-mail: bruno_acontrucci@hotmail.com

Caroline Cestari

Residente de Pediatria

Instituição: Hospital da Criança e Maternidade - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (HCM-FAMERP), Departamento de Pediatria, São José do Rio Preto - São Paulo
Endereço: Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, São José do Rio Preto - São Paulo, CEP: 15090-000

E-mail: caroline_cestari@hotmail.com

Gabriel Arid Zeinum

Graduado em Medicina

Instituição: União das Faculdades dos Grandes Lagos
Endereço: Rua Dr. Eduardo Nielsen, 960, Jardim Novo Aeroporto, São José do Rio Preto - São Paulo, CEP: 15030-070

E-mail: aridservicosmedicos@gmail.com

Gabriel Velloso de Araujo Neto

Residente de Pediatria

Instituição: Hospital da Criança e Maternidade - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (HCM-FAMERP), Departamento de Pediatria, São José do Rio Preto - São Paulo
Endereço: Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, São José do Rio Preto - São Paulo, CEP: 15090-000

E-mail: gabriel.araujo@me.com

Gabriela Maria de Paula Davoglio

Graduanda em Medicina

Instituição: Centro Universitário Estácio
Endereço: Rua Abrahão Issa Halach, 980, Ribeirânia, Ribeirão Preto - São Paulo, CEP: 14096-160

E-mail: gabidavoglio@hotmail.com

João Pedro Latorre

Graduando em Medicina

Instituição: Faculdade Ceres

Endereço: Avenida Anísio Haddad, 6751, Jardim Francisco Fernandes, São José do Rio Preto – São Paulo, CEP: 15090-305

E-mail: jpedrolatorre@gmail.com

Jorge Sabino da Silva Neto

Residente de Pediatria

Instituição: Hospital da Criança e Maternidade - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (HCM-FAMERP), Departamento de Pediatria, São José do Rio Preto - São Paulo

Endereço: Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, São José do Rio Preto - São Paulo, CEP: 15090-000

E-mail: jorgesabinoneto08@gmail.com

Júlia Moraes Castro

Graduanda em Medicina

Instituição: Universidade Brasil

Endereço: Estrada Projetada F1, S/N, Fazenda Santa Rita, Fernandópolis - São Paulo, CEP: 15600-000

E-mail: julinhamcastro@hotmail.com

Larissa Maria de Paula Davoglio

Graduanda em Medicina

Instituição: Centro Universitário Estácio

Endereço: Rua Abrahão Issa Halach, 980, Ribeirânia, Ribeirão Preto – São Paulo, CEP: 14096-160

E-mail: larissamariadavoglio@gmail.com

Luiza Latorre

Residente de Pediatria

Instituição: Hospital da Criança e Maternidade - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (HCM-FAMERP), Departamento de Pediatria, São José do Rio Preto - São Paulo

Endereço: Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, São José do Rio Preto - São Paulo, CEP: 15090-000

E-mail: lu-latorre@hotmail.com

Luiza Meireles de Castro

Residente de Pediatria

Instituição: Hospital da Criança e Maternidade - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (HCM-FAMERP), Departamento de Pediatria, São José do Rio Preto - São Paulo

Endereço: Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, São José do Rio Preto - São Paulo, CEP: 15090-000

E-mail: draluizameireles@gmail.com

Luiz Augusto Nacarato Júnior

Residente de Pediatria

Instituição: Hospital da Criança e Maternidade - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (HCM-FAMERP), Departamento de Pediatria, São José do Rio Preto - São Paulo
Endereço: Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, São José do Rio Preto - São Paulo, CEP: 15090-000

E-mail: juniornacarato@hotmail.com

Mariana Neuenschwander Mendonça

Residente de Pediatria

Instituição: Hospital da Criança e Maternidade - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (HCM-FAMERP), Departamento de Pediatria, São José do Rio Preto - São Paulo
Endereço: Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, São José do Rio Preto - São Paulo, CEP: 15090-000

E-mail: mariananeuel@gmail.com

Thayna Karolina Gomes Fernandes

Residente de Pediatria

Instituição: Hospital da Criança e Maternidade - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (HCM-FAMERP), Departamento de Pediatria, São José do Rio Preto - São Paulo
Endereço: Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, São José do Rio Preto - São Paulo, CEP: 15090-000

E-mail: thaynakarolina_10@hotmail.com

Thaise Graminha Lucas

Residente de Pediatria

Instituição: Hospital da Criança e Maternidade - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (HCM-FAMERP), Departamento de Pediatria, São José do Rio Preto - São Paulo
Endereço: Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, São José do Rio Preto - São Paulo, CEP: 15090-000

E-mail: thaisegl.uru@hotmail.com

RESUMO

O aumento da incidência de bactérias resistentes às múltiplas classes de antimicrobianos, principalmente Gram-negativas de prevalência nosocomial, têm se mostrado como grande ameaça à saúde pública internacional. O desenvolvimento de terapias alternativas que não induzem resistência bacteriana se mostra necessária e promissora. Este estudo objetivou avaliar a ação de extratos naturais derivados de plantas e terapia fotodinâmica no controle *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* cultivadas *in vitro*, através da determinação de concentrações inibitórias e bactericidas mínimas, e quantificação de unidades formadoras de colônias após exposição dos respectivos agentes, variando em tempo e concentração. Evidenciou-se ação dos extratos de limão taiti, tangerina e laranja amarga em diferentes concentrações. Neste estudo, a tangerina (*Citrus tangerina*) causou efeito inibitório e bactericida com menor quantidade em ambas as bactérias quando comparada aos outros extratos, porém, com maior concentração necessária na *A. baumannii* quando comparada à *P. aeruginosa*. Em relação à terapia fotodinâmica, foi evidenciada redução expressiva na quantidade de bactérias existentes no ambiente exposto, principalmente por maior quantidade de tempo, porém, sem garantir efeito inativação total de tais bactérias. A atividade antimicrobinada evidenciada no estudo, de ambas as terapias, demonstra a possibilidade de

desenvolvimento de agentes adjuvantes no controle de replicação bacteriana com baixo custo e boa eficácia, sem risco de resistência bacteriana adicional.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, plantas medicinais, fotoquimioterapia.

ABSTRACT

The increased incidence of bacteria resistant to multiple classes of antimicrobials, mainly Gram-negative nosocomial prevalence, has been shown a major threat to international public health. The development of alternative therapies that do not induce bacterial resistance is necessary and promising. This study aimed to evaluate the action of natural extracts derived from plants and photodynamic therapy in control of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* cultivated *in vitro*, through the determination of minimum inhibitory and bactericidal concentrations, and quantification of colony forming units after exposure of the respective agents, changing in time and concentration. The action of lemon tahiti, tangerine and bitter orange extracts at different concentrations was evidenced. In this study, tangerine caused an inhibitory and bactericidal effect with a lower amount in both bacteria when compared to the other extracts, however, with a higher concentration required in *A. baumannii* when compared to *P. aeruginosa*. Regarding photodynamic therapy, there was a significant reduction in the amount of bacteria in the exposed environment, mainly for a longer period of time, although without ensuring the total inactivation of such bacteria. The antimicrobial activity evidenced in the study, of both therapies, demonstrates the possibility of developing adjuvant agents in the control of bacterial replication with low cost and good efficacy, without risk of additional bacterial resistance.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, medicinal plants, Photochemotherapy.

1 INTRODUÇÃO

O *Acinetobacter baumannii* apresenta-se como um dos principais patógenos responsáveis por surtos hospitalares, principalmente em ambiente de unidade de terapia intensiva. Compostos por pacientes gravemente enfermos, imunodeprimidos, invadidos constantemente por diversos dispositivos, e associados à grande variabilidade do uso de antimicrobianos, caracteriza este ambiente onde tal bacilo ou cocobacilos aeróbios Gram negativos se faz mais prevalente.¹

Amplamente reconhecido como germe oportunista, geralmente esta associado a infecções polimicrobiana, já que possui capacidade de colonizar e infectar de forma persistente. Tal fato se deve, principalmente, a formação de biofilmes e mecanismos intrínsecos para resistência aos principais antimicrobianos, os antibióticos carbapenêmicos, impactando diretamente na segurança e qualidade de tratamentos hospitalares.²

O *A. baumannii* possui resistência intrínseca a múltiplas classes de antimicrobianos, restando poucas opções no seu tratamento. A utilização em larga escala e de forma

indiscriminada de antibióticos levou o aparecimento de espécies de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (CRAB). Pelo fato de ser a principal classe medicamentosa utilizada, foi considerado pela Organização Mundial da Saúde em 2017, um problema de saúde global devido a aumento da incidência de dessas bactérias resistentes, tendo como prioridade o controle de sua disseminação.³

Neste mesmo contexto, a *Pseudomonas aeruginosa* apresenta-se como outra bactéria de importante significado epidemiológico. Bacilo Gram-negativo e não fermentador de glicose, é considerada também um germe oportunista e com alta prevalência em ambiente nosocomial. Segundo a National Healthcare Safety Network (NHSN), apresenta-se mundialmente como frequente causador de infecções do trato urinário associado a cateter, pneumonia associada à ventilação mecânica e infecções de corrente sanguínea.⁴

Diferentemente do *A. baumannii*, sua sensibilidade a classes de antimicrobianos é variável. Padrões de resistência variam geograficamente e por tipo sítio de infecção. Tal fato ocorre devido a múltiplas formas de resistência, como por exemplo, enzimas degradantes, permeabilidade reduzida e efluxo ativo, garantindo maior seletividade de acordo com o ambiente inserido e droga mais utilizada.⁵

Atualmente, existe um crescimento significativo de *P. aeruginosa* produtoras de enzimas que degradam antimicrobianos beta-lactâmicos, classe medicamentosa principal no seu combate, sendo chamadas de betalactamases de espectro estendido (ESBL). Tal fato resulta em uma redução exponencial do arsenal terapêutico até então existente, culminando em impacto direto e indireto na qualidade de tratamentos hospitalares.⁶

Assim, diante desse cenário de aumento constante de resistência bacteriana aos principais antimicrobianos existentes, surge a necessidade de estudos dos métodos alternativos para controle de tal situação atual. Apesar do desenvolvimento constante de novas tecnologias associados ao cuidado de pacientes críticos, o surgimento de novas terapêuticas que impactam no controle e tratamentos de infecções bacterianas se aquém da real necessidade.⁷

Extratos naturais derivados de plantas, compostos por produtos do metabolismo secundário de suas folhas, raízes e caules, são comumente conhecidos como óleos essenciais. Por apresentarem diversos compostos bioativos com elevada complexidades, com função primária de proteção aos vegetais, apresentam efeitos antioxidantes e antimicrobianas.⁸

Por interagir diretamente com compostos da membrana celular e diversos outros componentes de patógenos, apresentam-se com importante atividade antibacteriana, antifúngica e antiparasitária. Somado a isso, pelo fato de serem compostas por diversas

moléculas bioativas, a resistência bacteriana se faz pouco provável de ser desenvolvida ou apresentar-se como intrínseca.⁹

Outra potencial terapêutica recentemente descoberta e em desenvolvimento na área da saúde, é a chamada terapia fotodinâmica. Composta por um agente fotossensibilizador (azul de metileno, por exemplo), água e oxigênio, apresenta-se com conceito de indução de grande quantidade de espécies reativas de oxigênios (EROS). Isso ocorre a partir da ativação do fotossensibilizador por meio de uma fonte de luz, formando esses compostos que interagem ativamente com componentes celulares de bactérias, causando ação antimicrobiana a partir da citotoxicidade.^{10,11}

Por apresentarem metabolismo acelerado e maior permeabilidade celular, as bactérias tendem a acumular maior quantidade de fotossensibilizador, o que permite efetividade direcionada a partir da emissão luz. Estudos *in vitro* sugerem que o efeito bactericida da terapia é variável de acordo com o tempo exposto ao fotossensibilizador, quantidade de luz recebida e tempo de exposição, se mostrando como terapia promissora no controle de crescimento microbiano.¹²

Assim, frente ao crescimento exponencial de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos associados à importância epidemiológica da morbimortalidade de doenças relacionadas à assistência a saúde, é imprescindível o estudo e desenvolvimento de novas formas de terapias antimicrobianas. Nesse contexto, objetivou-se estudar, *in vitro*, a eficácia dos óleos essenciais e terapia fotodinâmica contra o crescimento de importantes bactérias nosocomiais, a *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 BACTÉRIAS

Foram utilizadas cepas padrão de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* isoladas previamente de laboratórios (ATCC P013 e 17978, respectivamente – American Type Culture Collection), sendo revitalizadas em ágar McConkey e ágar sangue, respectivamente, e incubadas a 37°C, por 24 horas. Após cultivo, foram expostas aos óleos essenciais e inativação fotodinâmica.

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Foram utilizados os óleos essenciais de tangerina (*Citrus tangerina*), limão taiti (*Citrus aurantifolia*), e laranja amarga (*Citrus aurantium*), adquiridos no comércio de produtos

naturais, de sendo extraídos diretamente das plantas, possuindo ésteres, cetonas, aldeídos, álcoois e cloroplastos das folhas utilizadas.

2.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais, foi utilizado o método de diluição em caldo, de acordo com a metodologia preconizada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013). Diluições seriadas dos óleos naturais foram preparadas em placas de microdiluição de 96 poços nas concentrações de 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3,125%.

Foram distribuídos em todos os poços das placas com 0,05 mL de caldo triptonsoja (TSB), sendo que nos primeiros poços de cada fileira foram adicionados mais 0,05 mL dos óleos essenciais avaliados de forma a representar diluição 1/2 (volume 0,1 mL). Esta diluição foi agitada com auxílio de uma micropipeta e 0,05 mL transferida para o poço seguinte, representando a diluição 1/4 (25%), e assim sucessivamente.

A seguir, acrescentou-se 0,05 mL da suspensão padronizada (10^6 células/mL) de cada cepa de bacteriana. O grupo controle positivo foi constituído de caldo TSB acrescido do inoculo microbiano avaliado e o grupo controle negativo constituído apenas de caldo TSB, a fim de avaliar possível contaminação durante a fase experimental.

A CIM foi considerada como a menor concentração de óleo capaz de inibir o desenvolvimento bacteriano, evidenciado após introdução de 50 microlitros do corante 2,3,5-Triphenyltetrazolum Chloride (Sigma), na qual há coloração vermelha após sua introdução (Sylvester, 2011).

Após incubação por 24 horas a 37°C, alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em duplicata, em placas de ágar TSA (tryptic soy agar) para determinação da concentração bactericida mínima (CBM). Após período de incubação de 24 horas a 37°C, foi verificada ausência ou presença de crescimento microbiano (unidades formadoras de colônias - UFC). Para determinação da CBM, foram consideradas as placas que apresentem ausência de crescimento bacteriano. Assim, a CBM foi considerada como a menor concentração de óleo que apresentou 0,01% de bactérias viáveis.

2.4 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA

Para inativação fotodinâmica foi empregado o fotossensibilizador (Fs) azul de metileno, utilizado na concentração de 0,1 mg/ml para cada amostra. O Fs foi dissolvido em água

bidestilada estéril, e filtrado em membrana estéril (Millipore, São Paulo, Brasil). A fonte de luz utilizada foi o laser com comprimento de onda de 660 nm, densidade de energia de 26,3 J/cm², energia de 10 J, potência 100 mW. Utilizados os tempos de 05, 10 e 15 minutos de irradiação numa área de 0,56 cm², gerando uma irradiação de 176,9 mW/cm².

As linhagens bacterianas cultivadas em meio caldo triptecaseína soja, por vinte e quatro horas a 37°C, quando serão centrifugadas por 1000g por 10 min, o sobrenadante desprezado e o pellet ressuscitado em solução estéril de NaCl (0,5%) e centrifugado novamente. Este procedimento foi repetido cinco vezes.

O pellet obtido foi ressuscitado em 1mL de solução estéril de NaCl 0,5%. Posteriormente, a partir da suspensão de 10⁶ células/mL de células viáveis foram realizados os ensaios, sendo seis para cada grupo experimental.

Esses ensaios serão divididos em 4 grupos experimentais: Grupo L- / F- (não irradiado com laser vermelho e ausência de azul de metileno), sendo este o grupo controle, Grupo L- / F+ (não irradiado com laser vermelho e presença de azul de metileno), Grupo L+ / F- (irradiado com laser vermelho e ausência de azul de metileno), L+ / F+ (irradiado com laser vermelho associado ao azul de metileno).

A amostra microbiana do grupo L- / F- constituída de 1,0mL da suspensão bacteriana e 0,05mL de solução fisiológica, as amostras microbianas dos grupos L-F+ e L+F+ constituídos 1,0mL da suspensão bacteriana e 0,05mL de solução de azul de metileno. Após a preparação, os microrganismos permaneceram por 15 min a 36 °C incubadas com azul de metileno (1mg/mL) em ambiente escuro e em seguida irradiadas ou não com laser vermelho.

A cada ciclo de cinco minutos, totalizando 15 min, foi removida uma alíquota de 0,1mL e cultivadas em meio ágar sangue para cultivo de *Acinetobacter baumannii* e ágar McConkey para cultivo de *P. aeruginosa*. As suspensões bacterianas foram uniformemente distribuídas e incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida foi realizado a contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) e os resultados foram expressos em log.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos Quadros 1 e 2, estão apresentados os resultados da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de tangerina (*Citrus tangerina*), limão taiti (*Citrus aurantifolia*) e laranja amarga (*Citrus aurantium*) frente à *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente.

Quadro 1. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de óleos essenciais sobre *Acinetobacter baumannii*.

Bactéria: <i>Acinetobacter baumannii</i>		
Tratamentos	Concentração dos Óleos Essenciais (%)	
Nome científico	CIM	CBM
<i>Citrus tangerina</i> (tangerina)	6,25	12,5
<i>Citrus aurantifolia</i> (limão taiti)	12,5	12,5
<i>Citrus aurantium</i> (laranja amarga)	12,5	25

Quadro 2. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de óleos essenciais sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

Bactéria: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
Tratamentos	Concentração dos Óleos Essenciais (%)	
Nome científico	CIM	CBM
<i>Citrus tangerina</i> (tangerina)	6,25	6,25
<i>Citrus aurantifolia</i> (limão taiti)	6,25	12,5
<i>Citrus aurantium</i> (laranja amarga)	12,5	12,5

É possível evidenciar que houve interação biológica entre compostos cítricos e as bactérias estudadas, havendo supressão de crescimento e atividade bactericida em concentrações variáveis. Quando comparado à outros estudos envolvendo bactérias Gram-positivas, principalmente *Staphylococcus aureus*, nota-se que as concentrações necessárias para gerar impacto na fisiologia bacteriana nestas bactérias Gram-negativas, foram maiores. Apesar das concentrações de bioativos existentes em extratos sofrerem variações, acredita-se que pelo fato das bactérias Gram-positivas possuírem parede celular, são passíveis de maiores interações moleculares, o que ocorre em menor grau em relação às estudadas.¹³

As concentrações dos extratos de tangerina e de laranja amarga, necessárias para inibirem o crescimento da *A.baumannii*, foi de 6,25% e 12,5%. Contudo, para atingir ação bactericida foi necessário o dobro da concentração, 12% e 25%, respectivamente. Quando analisado o extrato de limão taiti, observa-se a mesma CIM e CBM, sendo 12,5% (Quadro 1).

Essa diferença nas concentrações também é vista na exposição da *P. aeruginosa*, onde o limão taiti apresentou CIM de 6,25% e CBM de 12,5%. Mas, diferente da *A. baumannii*, os extratos de tangerina e laranja amarga apresentaram-se com mesmo CIM e CBM, de 6,25% e 12,5% respectivamente (Quadro 2).

Essa variabilidade de resultado se deve ao fato de que os extratos são compostos por diferentes moléculas que interagem com as bactérias de variáveis formas e também não relacionados a alvos específicos. Desintegração de membrana celular, desestabilização de

moléculas, alteração de fluxo eletro-iônico e alteração de permeabilidade, estão entre os principais mecanismos envolvidos.¹⁴

Pelo fato de haver interação com diversos componentes, os extratos assumem característica importante e promissora na utilização como controle bacteriano já que a indução de resistência é mínima. Além disso, possuem baixa toxicidade, variadas ações farmacológicas e maior viabilidade econômica quando comparados à compostos químicos produzidos em laboratórios.¹⁵

Já nos quadros 3 e 4, apresentam-se os resultados da interação das bactérias estudadas em relação ao fotossensibilizados (azul de metileno) isolado (FS), fonte de luz ativadora isolada e combinação de ambos, o qual se configura a terapia fotodinâmica, variando de acordo com a quantidade de minutos exposta.

Quadro 3. Contagem total de UFC/ml (Log10) de *A.baumannii* após exposição à terapia fotodinâmica (TDF), ao laser isolado (Laser) e azul de metileno isolado (FS), em comparação ao grupo não exposto (Controle), com variação do tempo de exposição (minutos). Densidade de energia usada foi de 26,3 J/cm².

<i>A.baumannii</i>	Minutos de exposição		
Grupos	5	10	15
L - / F - (Controle)	7,12	7,12	7,13
L - / F + (FS)	7,13	7,13	7,14
L + / F - (Laser)	9,53	9,57	9,62
L + / F + (TDF)	3,82	3,52	3,15

Quadro 4. Contagem total de UFC/ml (Log10) de *P. aeruginosa* após exposição à terapia fotodinâmica (TDF), ao laser isolado (Laser) e azul de metileno isolado (FS), em comparação ao grupo não exposto (Controle), com variação do tempo de exposição (minutos). Densidade de energia usada foi de 26,3 J/cm².

<i>P. aeruginosa</i>	Minutos de exposição		
Grupos	5	10	15
L - / F - (Controle)	7,16	7,17	7,18
L - / F + (FS)	7,18	7,19	7,19
L + / F - (Laser)	10,19	10,28	10,38
L + / F + (TDF)	3,94	3,32	3,01

Nota-se, em um primeiro momento, que o FS não interferiu no crescimento de ambas as bactérias, podendo ser inferido que não apresenta ação citotóxica de forma isolada. Tal fato deve ser levado em conta pois para potencial uso medicinal, tal substância não deve interferir negativamente no metabolismo celular, seja bacteriano ou células teciduais, por exemplo.¹⁶

Da mesma forma que diversos relataram, quando expostas à somente irradiação com densidade energética de 26,3 J/cm² e comprimento de onda de 660 nm, foi possível notar um crescimento expressivo da contagem de bactérias, onde a *P. aeruginosa* cresceu cerca de 3 log's e *A. baumannii* cerca de 2,5 log's, aumentando conforme maior quantidade de tempo exposta.

Isso se deve ao efeito bioestimulador de reações químicas gerado pelo comprimento de onda utilizado e intensidade de luz.¹⁷

Porém, quando utilizado em associação com FS, houve clara redução da quantidade de colônias bacterianas existentes. Na *A. baumannii*, quando exposta por 15 minutos, houve redução de 4 log's em comparação à 5 minutos, no qual houve redução de 3,3 log's. Esse resultado também foi notado na *P. aeruginosa*, sendo de 3,2 log's em 5 minutos e 4,17 log's em 15 minutos.

Contudo, apesar de ser possível evidenciar que quanto maior o tempo de exposição, maior o impacto no crescimento bacteriano, com redução importante na quantidade de unidades formadoras de colônias, não foi possível inativar completamente as cepas estudadas.

Assim como diversos autores, esse efeito antimicrobiano parcial se deve a diversos fatores. Além da própria resistência intrínseca de cepas bacterianas a formação de espécies reativas de oxigênio, o comprimento de onda, intensidade de luz e fotossensibilizador utilizado, interferem ativamente em tal processo.¹⁷⁻¹⁹

Por fim, foi possível notar que caso a quantidade de FS não seja suficiente para interação completa das bactérias existente no meio, a exposição isolada à fonte de energia pode causar efeito contrário e estimular a formação de novas colônias. Tal fato, quando avaliado isoladamente, pode causar desestímulo a sua utilização.

Contudo, novas terapêuticas devem ser desenvolvidas como intuito adjuvante à terapias já existentes, como por exemplo antibióticos. Isso porque, apesar do estudo realizado demonstrar que não houve supressão total do crescimento quando expostas a terapia fotodinâmica ou necessidade de concentrações muito elevadas de extratos orgânicos, houve prejuízo no desenvolvimento das cepas além de, provavelmente, não ter induzido resistência.

Apesar da necessidade de maior quantidade de estudos relacionados a ambas as terapias, mostram-se com poder promissor em diversos estudos, demonstrando impactos significativos em diversos microrganismos além de baixo custo para o uso.

REFERÊNCIAS

- ¹ Kurihara MNL, Sales RO, Silva KED, Maciel WG, Simionatto S. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreaks: a global problem in healthcare settings. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020;53:e20200248.
- ² Rocha IV, Xavier DE, Almeida KRH de, Oliveira SR de, Leal NC. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clones persist on hospital inanimate surfaces. *Brazilian J Infect Dis.* 2018;22(5):438-41.
- ³ Gao L, Lyu Y, Li Y. Trends in drug resistance of *Acinetobacter baumannii* over a 10-year period: Nationwide data from the China surveillance of antimicrobial resistance program. *Chin Med J (Engl).* 2017;130(6):659-64.
- ⁴ Weiner-Lastinger LM, Abner S, Edwards JR, Kallen AJ, Karlsson M, Magill SS, Pollock D, See I, Soe MM, Walters MS, Dudeck MA. Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015-2017. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2020;41(1):1.
- ⁵ Lee YL, Ko WC, Hsueh PR. Geographic Patterns of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Asia-Pacific Region: Results from the Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance (ATLAS) Program, 2015-2019. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022;66(2):e0200021.
- ⁶ Bassetti M, Echols R, Matsunaga Y, Ariyasu M, Doi Y, Ferrer R, Lodise TP, Naas T, Niki Y, Paterson DL, Portsmouth S, Torre-Cisneros J, Toyozumi K, Wunderink RG, Nagata TD. Efficacy and safety of cefiderocol or best available therapy for the treatment of serious infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria (CREDIBLE-CR): a randomised, open-label, multicentre, pathogen-focused, descriptive, phase 3 trial. *Lancet Infect Dis.* 2021;21(2):226.
- ⁷ Karam G, Chastre J, Wilcox MH, Vincent JL. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. *Crit Care.* 2016;20(1):136
- ⁸ Man A, Santacroce L, Jacob R, Mare A, Man L. Antimicrobial Activity of Six Essential Oils Against a Group of Human Pathogens: A Comparative Study. *Pathogens.* 2019 Jan 28;8(1):15.
- ⁹ Soliman SSM, Alsaadi AI, Youssef EG, Khitrov G, Noreddin AM, Hussein MI, Ibrahim AS. Calli Essential Oils Synergize with Lawsonia against Multidrug Resistant Pathogens. *Molecules.* 2017 Dec 20;22(12):2223.
- ¹⁰ Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzińska E, Knap-Czop K, Kotlińska J, Michel O, Kotowski K, Kulbacka J. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother.* 2018 Oct;106:1098-1107.
- ¹¹ Monteiro TC, Franco CB, Feitosa EA, De Araújo MA, Brígido JA. Terapia fotodinâmica antimicrobiana: uma modalidade promissora no tratamento da estomatite protética / Antimicrobial photodynamic therapy: a promising modality in the treatment of prosthetic stomatitis. *Brazilian Journal of Health Review, [S. l.], v. 4, n. 6, p. 25886–25893, 2021.*

- ¹² Pérez-Laguna V, García-Luque I, Ballesta S, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, Rezusta A, Gilaberte Y. Photodynamic therapy using methylene blue, combined or not with gentamicin, against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020 Sep;31:101810.
- ¹³ Borges, GBV; Machado, AMR; Gomes, FCO; Garcia, CF. Extraction, characterization and microbiological evaluation of essential oils from commercial citrus waste. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 10, n. 7, p. e1110716126, 2021.
- ¹⁴ Mo, T.; Adebayo OS, A. Plant essential oil: an alternative to emerging multidrug resistant pathogens. *J. Microbiol. Exp.*, v.5, p.1-10, 2017.
- ¹⁵ Sakkas H, Gousia P, Economou V, Sakkas V, Petsios S, Papadopoulou C. In vitro antimicrobial activity of five essential oils on multidrug resistant Gram-negative clinical isolates. *J Intercult Ethnopharmacol*. 2016 May 30;5(3):212-8
- ¹⁶ Toni AG, Passos RM, Lima GSC, Mattos Neto RB. Terapia fotodinâmica com verteporfina associada à injeção intravítrea de antifator de crescimento endotelial vascular para tratamento de hemangioma circunscrito de coróide. *Rev. bras.oftalmol.*, v. 81, e0030, abr. 2022.
- ¹⁷ Decarli MC, Carvalho MT, Corrêa TQ, Bagnato VS, de Souza CW. Different Photoresponses of Microorganisms: From Bioinhibition to Biostimulation. *Curr Microbiol*. 2016 Apr;72(4):473-81.
- ¹⁸ Pereira de Lima Carvalho D, Guerra Pinto J, Di Paula Costa Sorge C, Rodrigues Benedito FR, Khouri S, Ferreira Strixino J. Study of photodynamic therapy in the control of isolated microorganisms from infected wounds--an in vitro study. *Lasers Med Sci*. 2014 Jan;29(1):113-20.
- ¹⁹ Oliveira BP, Lins CCSA, Diniz FA, Melo LL, Castro MMBC. In Vitro antimicrobial photoinactivation with methylene blue in different microorganisms. *Braz J Oral Sci*. 2014 Jan-Mar 13(1):53-57.