



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR



EDUARDO CÂNDIDO DA SILVA

**AÇÃO DA ILUMINAÇÃO POR LED DE ALTA POTÊNCIA SOBRE
Pseudomonas aeruginosa UFPEDA 416 EXPOSTA À CURCUMINA**

JOÃO PESSOA - PB

2022

EDUARDO CÂNDIDO DA SILVA

**AÇÃO DA ILUMINAÇÃO POR LED DE ALTA POTÊNCIA SOBRE
Pseudomonas aeruginosa UFPEDA 416 EXPOSTA À CURCUMINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em biologia celular e molecular

Orientador: Prof. Drº. Ulrich Vasconcelos da Rocha
Gomes

JOÃO PESSOA - PB

2022

**Catálogo na publicação Seção de Catalogação e
Classificação**

S586a Silva, Eduardo Cândido da.

Ação da iluminação por led de alta potência sobre
pseudomonas aeruginosa ufpeda 416 exposta à curcumina /
Eduardo Cândido da Silva. - João Pessoa, 2022.

52 f. : il.

Orientação: Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Biologia celular. 2. Crescimento microbiano. 3.
Células planctônicas. I. Gomes, Ulrich Vasconcelos da
Rocha. II. Título.

UFPB/BC

CDU 576(043)

EDUARDO CÂNDIDO DA SILVA

**AÇÃO DA ILUMINAÇÃO POR LED DE ALTA POTÊNCIA SOBRE
Pseudomonas aeruginosa UFPEDA 416 EXPOSTA À CURCUMINA**

Dissertação de Mestrado avaliada em 30 de setembro de 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr^o. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (DB/UFPB)
Orientador/ Presidente

Kally Alves
Sousa:04212902699

Assinado de forma digital por
Alves de
Dados: 2022.11.22 20:35:40

Prof^a. Dr^a. Kally Alves de Sousa (IFRO – Campus Guajará-Mirim)
Examinadora Externa

Prof^o. Dr^o. Rafael de Almeida Travassos (DBCM/UFPB)
Examinador Interno

Emitido em 30/09/2022

FOLHA Nº 3/2022 - CBIOTEC - LAMA (11.01.44.07)
(Nº do Documento: 3)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 25/11/2022 13:39)
RAFAEL DE ALMEIDA TRAVASSOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
1956521

(Assinado digitalmente em 25/11/2022 13:39)
ULRICH VASCONCELOS DA ROCHA GOMES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
2009494

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpb.br/documentos/> informando seu número: **3**,
ano: **2022**, documento (espécie): **FOLHA**, data de emissão: **25/11/2022** e o código de verificação: **35c184586a**

AGRADECIMENTOS

Neste momento, externizo minha eterna gratidão a Deus pelo dom da vida e por todas às oportunidades concedidas a mim. Agradeço, pelas bênçãos alcançadas, por me atribuir à capacidade de concluir mais uma etapa da realização de um sonho.

Agradeço a Deus pelo bom ânimo, por sempre ter me sustentado me garantido saúde, forças e esperança; sobre tudo a capacidade de resiliência neste momento de pandemia.

Graças te dou Deus pela minha família, pois é o alicerce de cada passo que avanço. Em especial a minha mãe Marinalva Cândido da Silva e ao meu pai, Paulo Afonso da Silva pelos exemplos de pessoas que são, pelo cuidado, amor e muita fé a mim agraciado. Por todo o suporte necessário para que eu pudesse chegar até aqui. Agradeço as minhas avós Amália e Maria Cândido por todo o incentivo nos estudos e cuidado.

Ao meu irmão Ewerton Cândido por sempre me incentivar, aos meus primos e amigos que sempre torceram por mim assim como depositaram admiração e confiança.

Ao meu orientador, Ulrich Vasconcelos, por todo o suporte acadêmico e por ser inspiração aos seus orientandos e alunos. Exemplo de pessoa e profissionalismo em toda a universidade. Sinto-me honrado em tê-lo como orientador. Agradeço pelo apoio, dedicação e compreensão nesta trajetória. Ter o cuidado de um bom orientador nos estudos facilitou a combater todos os obstáculos.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente somaram atributos para a concretização desta realização.

À UFPB e ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e molecular por todo o suporte intelectual e espaços ofertados para a realização das minhas atividades.

“E tudo o que pedires em oração, crendo, o recebereis”.

Mateus 21:22

SILVA, Eduardo Cândido. Ação da iluminação por LED de alta potência sobre *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416 exposta à curcumina. João Pessoa, 2022. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular – Microbiologia) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, 2022.

RESUMO

A energia luminosa pode ser empregada no combate ao crescimento microbiano e a Terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) tem o potencial de utilizar diferentes compostos naturais como fotossensibilizadores. A curcumina é um exemplo de molécula em ascensão em diferentes áreas sob diferentes ópticas. Este trabalho teve como objetivo, avaliar o efeito de um fotossensibilizador natural (Curcumina) sob as células planctônicas e formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416 em comprimento de onda de 480 nm emitido por uma lâmpada de LED de alta frequência. Para isso, foram conduzidos ensaios *in vitro* de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e CBM (Concentração bactericida mínima) da curcumina, sendo identificada a CIM de 0,63 µg/mL sem atividade biocida. No ensaio de formação do biofilme foi utilizada a CIM da curcumina. Uma suspensão de *P. aeruginosa* UFPEDA 416 foi exposta durante 20, 40, 60 e 120 minutos à energia luminosa (28,03 mW/cm²) e em seguida, alíquotas de 100 µL foram transferidas para microtubos contendo caldo Mueller-Hinton e incubadas à 30°C por 24 h. Após os ensaios, o biofilme formado foi quantificado utilizando o método do cristal violeta. A taxa de adesão foi calculada usando a diferença da absorbância a $\lambda = 590$ nm do tratamento, comparado ao controle. Os resultados demonstraram que houve redução na capacidade de adesão: de 40,8% nos primeiros 20 minutos até cerca de 11%, a partir de 60 minutos, mantendo o valor até o final. Este resultado acompanhou a redução das células planctônicas, caracterizando a curcumina como um bom fotossensibilizador.

Palavras-chaves: Terapia fotodinâmica antimicrobiana, sistema LED, Curcumina, fotossensibilizador natural

SILVA, Eduardo Cândido. Action of high potency LED light on *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416 exposed to curcumin. João Pessoa, 2022. Theses. (Master in Celular and Molecular Biology – Microbiology) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, 2022.

ABSTRACT

Light energy can be used to control microbial growth and Antimicrobial Photodynamic Therapy (PDTa) has the potential to use different natural compounds as photosensitizers. Curcumin is an example of a molecule on the rise in different areas from different perspectives. This study aimed to evaluate the effect of a natural photosensitizer (Curcumin) on planktonic cells and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416 at 480 nm emitted by a high frequency LED lamp. For this, *in vitro* assays were carried out to determine the Minimum Inhibition Concentration (MIC) and MBC (Minimum Bactericidal Concentration) of curcumin. MIC was detected at 0.63 µg/mL with no biocide effect. In the biofilm formation assay, *P. aeruginosa* UFPEDA 416 was exposed to curcumin (MIC concentration) and light energy (28.03 mW/cm²) for 20, 40, 60 and 120 minutes. Then, aliquots of 100 µL were transferred to microtubes containing Mueller-Hinton broth and incubated at 30°C for 24 h. Biofilm was quantified using the violet crystal method. The results showed that there was a reduction in the ability of forming biofilm: from 40.8% in the first 20 minutes up to 11%, from 60 minutes, kept until the end. These results followed the decrease of planktonic cells, highlighting curcumin as potential photosensitizer.

Keywords: Antimicrobial photodynamic therapy, LED system, Curcumin, natural photosensitizer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Etapa da formação de um biofilme por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
Figura 2	Estrutura tautomérica keto-enol da curcumina	17
Figura 3	Representação da caixa de madeira contendo o dispositivo LED	22
Figura 4	CIM da curcumina em microplacas de 96 poços	25
Figura 5	Microplaca no teste de determinação da CBM (Concentração Bactericida Mínima)	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da curcumina sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 416	24
Tabela 2	Densidade ótica das células sésseis e planctônicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 416 e seus percentuais de adesão e redução (% red) frente a 10 µg/mL de curcumina em diferentes tempos de exposição à luz de LED ($\lambda=480$ nm)	26

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	11
1.1- <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	11
1.2-BIOFILMES	12
1.3-TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (TFDa)	14
1.4-LED (<i>LIGHT-EMITTING DIODE</i>)	15
1.5-FOTOSENSIBILIZADORES (FS)	16
1.6-A CURCUMINA (AÇAFRÃO-DA-ÍNDIA)	17
2-OBJETIVOS	19
2.1-OBJETIVO GERAL	19
2.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3-MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1-LOCAL DO EXPERIMENTO	20
3.2-MICROORGANISMO	20
3.3-CURCUMINA	20
3.4-DETERMINAÇÃO DA CIM	20
3.5-DETERMINAÇÃO DA CBM	21
3.6-ENSAIO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME	21
3.6.1-DESCRIÇÃO DO REATOR	21
3.6.2-ENSAIO <i>IN VITRO</i> DA FORMAÇÃO DO BIOFILME	22
3.6.3-CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO	23
QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS PLANCTÔNICAS	23
3.6.5-EXPRESSÃO DOS DADOS	23
4-RESULTADOS	23
4.1-ATIVIDADE DA CURCUMINA NAS CÉLULAS PLANCTÔNICAS DA <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> UFPEDA 416	24
4.2-TESTE <i>IN VITRO</i> DA FORMAÇÃO DO BIOFILME	25
5-DISCUSSÃO	27
6-CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35
APÊNDICE A – ARTIGO DE REVISÃO	

1 INTRODUÇÃO

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo monoflagelado medindo 1,5 a 3,0 μm de comprimento e 0,5 a 0,7 μm de diâmetro, sendo o genoma contendo aproximadamente 6.5 Mbp. Além disso, é uma bactéria aeróbia, não fermentadora de açúcares que pode degradar uma gama de substratos, tais como proteínas, gorduras e carboidratos (MIELKO et al., 2019). Adicionalmente, também pode assimilar substratos não convencionais como fonte de carbono e energia, por exemplo, hidrocarbonetos do petróleo (PINHATI et al., 2014) e corantes azo (BARRETO; FERNANDES; CAMPOS-TAKAKI., 2007).

A bactéria cresce em meio de cultura em temperaturas que variam entre 37°C e 42°C e sintetizam pigmentos como; pioverdina, piocinina, piorrubina e piomelanina, principalmente em condições de estresse (FERREIRA, 2009). A junção dos pigmentos piocianina com o pioverdina resulta na coloração amarelo-esverdeada sendo comum para a maioria dos espécimes de *P. aeruginosa* (BERNARDO, 2009). Quando a bactéria tende a agrupar-se formando colônias, há facilidade de desenvolver biofilmes, sintetizando alginato, isto é, substância que promove a proteção estrutural e estabilidade do biofilme em *P. aeruginosa* (PISANI; TONUCCI; INNOCENTINI, 2008).

Em complemento, a bactéria é um microrganismo modelo em estudos relacionados a biofilmes. É classificada como uma bactéria oportunista, por ser responsável em acarretar infecções graves. É encontrada em ambiente diversificado como água e solo. Geralmente está associada a infecções hospitalares, colonizando pacientes com o sistema imunológico comprometido assim como desenvolvimento de infecções do trato urinário (ITU), pneumonias, endocardites, meningites e principalmente os pulmões de pacientes com fibrose cística, causando redução dos mecanismos de defesa do hospedeiro podendo levar a morte desses indivíduos (GHOLAMI et al., 2017).

Neste contexto, a *P. aeruginosa* apresenta resistência a uma ampla variedade de antimicrobianos que pode ser intrínseca ao próprio microrganismo, justificando-se devido à baixa permeabilidade de sua membrana e a capacidade de formar biofilme, ou adquirida pela associação no solo, com microrganismos que possui resistência previa a algum antimicrobiano. Por ser um microrganismo versátil, apresentando alto poder de adaptabilidade a diversos ambientes, pode carrear plasmídeos e genes que lhe conferem multirresistência (MAIA et al., 2009).

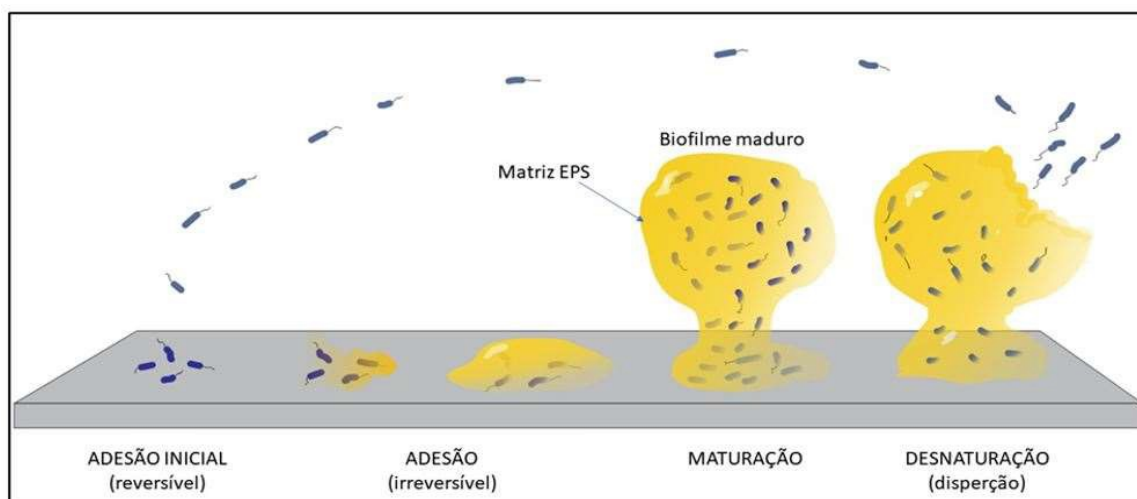
A bactéria está sob contínua pressão seletiva em ambientes hospitalares, por tal razão, se constitui em um dos paradigmas da resistência bacteriana, pois é facilmente capaz de apresentar todos os mecanismos de resistência quando comparada com outras bactérias, os quais incluem a produção de enzimas inativadoras, a exemplo das betalactamases, utilização de bombas de efluxo, resistência a aminoglicosídeos (SANTOS et al., 2015) produção de alginato, motilidade, mutações cromossômicas entre outros (STREETER; KATOULI, 2016). Entretanto, a *P. aeruginosa* aumenta sua patogenicidade levando a síntese de fatores de virulência quando exposta a situações de estresse ou quando altera seu modo de crescimento, alternativamente levando a formação de biofilmes (RODRIGUES, 2014).

BIOFILMES

O conceito de biofilmes é amplamente diversificado para bactérias que têm a capacidade de formar comunidades complexas de modo cooperativo e habitualmente cercadas por substâncias de matriz extracelular polimérica (EPS). Diferentes componentes estão envolvidos na formação da EPS, estes incluem (água 96%, polissacarídeos 1-2%, lipídios <1%, proteínas >2%, DNA <1% e RNA <1%), presente em superfícies úmidas ou em meio aquoso (COSTERTON; WILSON, 2004).

Anthony Van Leeuwenhoek (1632- 1723) e Louis Pasteur (1822-1895) realizaram pesquisas primitivas voltada para observações de biofilmes, analisando materiais do raspado bucal e agregados de bactérias como a causa do vinho se tornar acético, respectivamente (HØIBY., 2017). Partindo dessas observações, anteriormente esses microrganismos só eram relatados em sua forma planctônica caracterizado pela vida livre, onde as células participam de um processo crucial para a propagação e posteriormente proliferação no ambiente (TRENTIN et al., 2014).

A transferência do estado planctônico (célula livre), para a formação do biofilme, é composta por 4 etapas (Figura 1), iniciando pela fixação dos microrganismos a uma superfície biótica ou abiótica (efeito *bottle*) denominado adesão reversível. Em seguida, células previamente aderidas se agrupam em microcolônias formando estruturas maiores apresentando um crescimento (irreversível), posteriormente, essas células passam por um processo denominado de maturação, tornando colônias robustas e desenvolvidas. Por fim, um biofilme maduro pode se desprender, expandindo para outras superfícies, de forma passiva ou ativa em um processo denominado dispersão (GHANBARI et al., 2016).

Figura 1– Etapas da formação de um biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*.

EPS- Exopolissacarídeos

Fonte: adaptado de Galie et al. (2018)

O surgimento da “teoria do biofilme” abriu duas linhas de empreendimento científico: o estudo da bioquímica e genética dos biofilmes e sua formação e, por outro lado, o desafio ao diagnóstico médico e o tratamento de infecções centradas no biofilme (EHRlich; ARCIOLA, 2012). No final da década de 1990, foram realizadas observações em microscopia confocal de laser de filmes biológicos vivos revelando que as microcolônias observadas eram compostas de material da matriz ($\pm 85\%$) e células ($\pm 15\%$) exibindo propriedades de um fluido viscoelástico (COSTERTON; WILSON, 2004).

Em condições apropriadas, os biofilmes podem existir em todos os tipos de superfícies como plástico, metal, vidro, partículas do solo, madeira, materiais médicos, tecidos vivos e alimentos. Neste contexto, estruturas associadas à parede celular bacteriana, auxiliam na adesão célula-superfície, que inclui: fimbrias, pilli, expressão de proteínas flagelinas, flagelos e exopolissacarídeos (EPS) (KOKARE et al., 2009).

As bactérias, assim como outros microrganismos têm a capacidade de adaptação se multiplicando em diversas superfícies por meio de estímulos do meio em que se encontram. Estes sinais juntos com os fatores genéticos associados geram várias alterações na comunidade bacteriana em formação induzindo excreção de substância extracelular mantendo a expansão desse aglomerado de microrganismos unidos e com aptidão em regular inúmeros genes via mecanismos de sinalização, denominado *quorum sensing* (QS). Esses agrupamentos podem se desenvolver em unidades que, em cerca de horas, chegam a dezenas de milhares formando um biofilme complexo, classificado conforme a composição desses microrganismos em monoespécie e multiespécies (BRANDWEIN; STEINBERG; MESHNER, 2016).

A formação de biofilmes está associada ao modo de proteção e persistência da colônia e permite que as bactérias resistam a diversas condições em ambientes adversos, especialmente pela escassez de nutrientes (GHOLAMI et al., 2017). Os biofilmes bacterianos compõem uma maquinaria de persistência aos membros da comunidade, normalmente associados à virulência, patogenicidade ou resistência quando observados no contexto do hospedeiro (BRANDWEIN; STEINBERG; MESHNER, 2016).

As primeiras imagens de biofilmes foram publicadas em 1977, evidenciando bactérias em aglomeração observadas em escarro de pacientes crônicos de fibrose cística, que foram infectados com fenótipos mucoides de *P. aeruginosa*. Todavia, a caracterização de biofilmes em superfícies ou secreções é tão arcaica quanto à microbiologia, mas o conceito de infecção por biomateriais de importância clínica, relacionada às infecções crônicas, a menos de 50 anos. Os experimentos realizados com biofilmes que se desenvolvem em placas de microdiluição utilizando a técnica de cristal violeta, facilitaram os estudos da habilidade de vários aglomerados bacterianos em forma de biofilmes aderentes e a relação entre antibióticos e bactérias de crescimento em filmes biológicos (HØIBY, 2017). Os modelos atuais sobre a arquitetura dos biofilmes de *P. aeruginosa* são em forma de cogumelo, podendo ser influenciado por diversas circunstâncias, assim como, motilidade bacteriana, disponibilidade de nutrientes e fatores ambientais (GHANBARI et al., 2016).

A bactéria também possui mecanismos complexos de resistência e/ou tolerância frente a antibióticos, desinfetantes e diferentes moléculas tóxicas. Esta resistência surge devido à sua capacidade de formar biofilme, inativação de enzimas, mutação do local-alvo e bombas de efluxo, alterando o microambiente. Adicionalmente, o microrganismo demonstra tolerância a tratamentos bactericidas alternativos (SHARMA et al., 2014). Por estas razões, estudos anteriores demonstram a necessidade de procurar outras formas de tratamento em indivíduos com infecções por *P. aeruginosa*, um dos exemplos citados foi a utilização de diodos emissores de luz (LED) (PETRINI et al., 2017).

TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (TFDa)

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) é uma técnica que envolve processos de fotoinativação em combinação com moléculas que funcionam como um potencializadores conhecido como Fotossensibilizadores (FS), classificados como sintéticos (corantes) ou naturais (pigmentos). Os mecanismos que regem a TFDa envolvem a interação do oxigênio molecular (O₂) e a luz visível em comprimento de onda adequado culminando a produção de

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), os quais podem oxidar os constituintes e organelas resultando em morte celular (SPRING et al., 2015).

Os efeitos fotodinâmicos podem ser explicados por dois mecanismos, o do Tipo I e o Tipo II. Os eventos que estão presentes no mecanismo Tipo I envolvem a participação do FS numa reação de transferência de elétrons entre a molécula do FS no estado de excitação S_1 e o substrato, formando íons radicais que podem reagir com o O_2 liberando intermediários de oxigênio fortemente reativos (superóxido de hidrogênio, peróxido de hidrogênio e radicais OH), capazes de sofrer oxidação com uma diversidade de biomoléculas. O mecanismo Tipo II participa de reações de transferência de energia entre o FS no estado T1 interagindo com o O_2 , cujo estado fundamental é o tripleto. Neste contexto, essas reações originam a formação de oxigênio singleto, uma espécie capaz de oxidar os componentes das organelas celulares progressivamente ocasionando a morte da célula (SPRING et al., 2015; HAMBLIN, 2016; BACELLAR et al., 2015).

LED (*LIGHT-EMITTING DIODE*)

O LED, do inglês *Light-Emitting Diode* (diodo condutor de luz, em tradução livre) é um dispositivo semicondutor que emite luz dentro de um espectro de comprimento de onda muito estreito e em combinação com fotossensibilizadores compostos, podem produzir efeitos antibacteriano denominado fotoinativação (KUMAR et al., 2017).

O princípio de funcionamento do LED consiste na transformação da energia elétrica em radiação. Estes dispositivos lançam rigorosos espectros de luz que variam em comprimentos de onda do ultravioleta (UV) ao visível para o infravermelho próximo (NIR) (OLIVEIRA et al., 2019). Seus efeitos dependem de diversos fatores tais como: comprimento de onda, densidade de potência e da população microbiana (PETRINI et al., 2017).

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de sistemas LED que emitem em espectro de UV (200 nm a 400 nm), especificamente LED UV C emitindo efeitos germicidas (220 nm a 290 nm), vem sendo aplicado de forma crescente como método de desinfecção de superfície em diversos meios, por exemplo; desde a assistência médica ao armazenamento de alimentos. Além disso, o LED UV oferece vantagens como; redução no consumo de energia, impacto ambiental e tamanho, fornecendo potencial para uma variedade de aplicações. Outras formas de inativação de microrganismos podem incluir a utilização de agentes químicos e a radiação. (GORA et al., 2019).

Trabalhos recentes desenvolvidos pelos cientistas japoneses Isamu Akasaki, Hiroshi Amano e Shuji Nakamura, culminaram com a invenção do LED azul. Visto que até a década

de 1990 era considerada tanto para a comunidade científica como para a indústria eletrônica, um desafio, complementando a tríade formada pelas cores vermelha, verde e azul produzindo a luz branca (OLIVEIRA et al., 2019).

A aplicação da luz baseada em terapias é evidentemente bem-sucedida, pois, contrastam bactérias através de mecanismos que cumprem independentemente do uso de antibióticos e seus problemas relacionados. É importante encontrar protocolo correto de luz LED para obter um efeito bactericida, intervir com a mesma luz, porém manipular com diferentes parâmetros é possível induzir diferentes fotorrespostas ao microrganismo: da estimulação à bioinibição. A literatura apresenta os dispositivos de LED como seguros, não térmicos, sem toxicidade e não invasivo, destacando até o momento, não possuírem histórico de efeitos colaterais (PETRINI et al., 2017). A utilização de dispositivos à base de LED além das características positivas citadas anteriormente demonstrou benefícios para a economia ambulatorial, por baixo consumo de energia, apresenta vida útil longa e baixo custo o que também favorece sua utilização em hospitais e ambulatórios (ALBERTO et al., 2016).

FOTOSSENSIBILIZADORES (FS)

A luz, incluindo LED, pode ser associada aos tratamentos antimicrobianos. A técnica é denominada por terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) ou quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT). Os fotossensibilizadores (FS) são moléculas que possuem coloração apresentando grupos cromóforos, tendo o potencial de ativação quando estimuladas pela absorção de radiação eletromagnética. Esses compostos quando excitados, interagem com substratos levando a formação de oxigênio singleto ou radicais que propicia a destruição celular (PERUSSI et al., 2008).

A caracterização da TFDa é baseada na utilização de um ou mais FS, tais como corantes sintéticos, o azul de toluidina (HAKIMIHA et al., 2014), eosina (ROLIM et al., 2012), azul de metileno (LEONEL et al., 2019), rosa de bengala (GUO et al., 2012) e verde malaquita (BAL et al., 2019).

No entanto, o uso de substâncias naturais bioativas e biodegradáveis são estratégias mais atrativas uma vez que podem ser aplicadas em substituição aos compostos sintéticos, relacionados a impactos ambientais. A curcumina, um diaril-heptanoide pertencente ao grupo dos curcuminoides foi extraído da raiz de *Curcuma longa* (L.) cujo potencial pode ser utilizado. O composto foi empregado como FS na TFDa, reduzindo a viabilidade de microrganismos em biofilmes de cárie dentária. O mecanismo de ação da TFDa é dependente

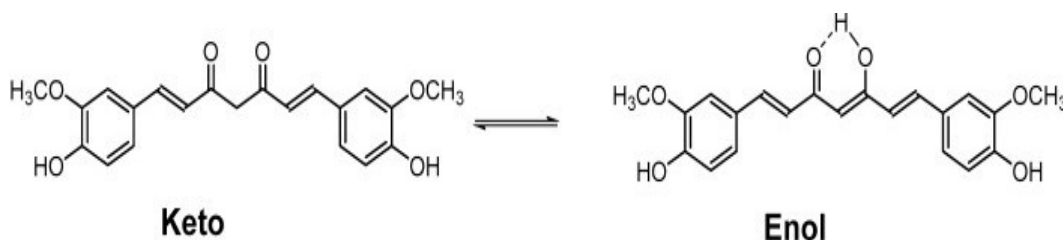
da combinação de três fatores: a natureza do FS, a fonte de luz com determinados comprimentos de ondas e o oxigênio exógeno (MÉNDEZ et al., 2019).

A CURCUMINA (AÇAFRÃO-DA-ÍNDIA)

A Curcumina, IUPAC 1,6-heptadieno-3,5-diana-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil), também conhecida como açafrão-da-Índia é um pigmento amarelo natural com propriedades bioativas relatadas mesmo antes do século I DC (Sueth- Santiago et al., 2015). A Curcumina é um Composto polifenólico, hidrofóbico, isolado a partir de rizomas da planta, habitualmente utilizado como produto natural aromatizante de alimentos. Pertencente à família Zingiberaceae, inclusa no grupo dos curcuminóides é um tautômero encontrado nas formas enol e ceto originária do sudeste asiático (MANOLOVA et al., 2014). A curcumina foi isolada pela primeira vez em 1815, mas apenas foram datadas as primeiras publicações evidenciando os seus efeitos benéficos em seres humanos em 1936 (JOE et al., 2004).

O pigmento obtido da curcumina pode exibir diversas cores dependendo da variação do pH que o meio se encontra, ou seja, marrom-avermelhado em meio alcalino ou amarelo quando neutro e ácido. Desse modo, podendo também ser usado como indicador de pH. A curcumina tem um efetivo valor terapêutico, e vem crescendo suas aplicações em diferentes modalidades médicas, dando ênfase no tratamento de doenças incluindo alergias, doenças autoimunes, câncer, doenças cardiovasculares entre outras. Atualmente a curcumina vem gerando bastante interesse nas clínicas odontológicas por seus efeitos benéficos tanto antibacterianos quanto antiinflamatórios (BARRETO; FERNANDES; CAMPOS-TAKAKI, 2019).

Figura 2- Estrutura tautomérica keto-enol da curcumina.



Fonte: (KOTHA; LUTHRIA, 2019)

Este composto tem uma gama de aplicações em diferentes segmentos que incluem ação antitumoral (KHALID et al., 2016) atividades antioxidante (HU et al., 2020), neuroprotetora (TOMEH et al., 2019) anti-inflamatório (FARHOOD et al., 2019), e antimicrobiana (MOGHADAMTOUSI et al., 2014) destacando as aplicações potenciais como agente bactericida podendo ser empregado como um FS ou em combinação com outras substâncias a fim de aumentar suas propriedades antibacteriana, atributos ideais como a capacidade de formar oxigênio singleto e excelente biocompatibilidade (ZHENG et al, 2020).

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de um fotossensibilizador natural (Curcumina) sobre a formação de biofilme na linhagem *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416 exposta à energia luminosa de LED azul.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Determinar a concentração inibitória mínima de Curcumina na linhagem teste;
- ❖ Determinar a concentração bactericida mínima (CBM);
- ❖ Avaliar a atividade antibiofilme da curcumina após exposição $\lambda = 480$ nm.

3 MATERIAL E MÉTODOS

LOCAL DO EXPERIMENTO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA), localizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba-UFPB campus I.

MICRORGANISMO

O estudo foi conduzido com a linhagem *P. aeruginosa* UFPEDA 416, doada pela Prof. Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima, curadora da Coleção de Microrganismos UFPEDA, do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. A linhagem é equivalente a *P. aeruginosa* ATCC 27853.

CURCUMINA

Para a realização dos experimentos foi utilizada curcumina (Merk, 1386-5G, Lote: SHBN4217), com grau de pureza de 65%. A solução padrão foi preparada em álcool 95%, obtendo-se a concentração inicial de 20 µg/mL.

DETERMINAÇÃO DA CIM

A determinação da CIM da curcumina sobre *P. aeruginosa* UFPEDA 416 foi realizada empregando a técnica de microdiluição em caldo Müeller-Hinton (MH), conforme descrito por Balouiri; Sadiki; Ibnsouda (2016). A suspensão do microrganismo foi preparada a partir da transferida de uma pequena quantidade de *P. aeruginosa* UFPEDA 416 incubada à 29°C em ágar cetrimida, transferida para 5 ml de solução salina (NaCl 0,9%), com turbidez padronizada com o tubo nº 1 da escala de MacFaland (300×10^6 UFC/mL).

Para a determinação da CIM, foram utilizadas microplacas de 96 poços, nelas foram adicionados aos poços 1º, 2º, 3º, 4º, 5º e 6º 100 µL de caldo MH duplamente concentrado; 100 µL da solução de curcumina preparada com concentração inicial no 1º poço de 10 µg/mL e final de 0,15 µg/mL, respectivamente, diluídos na razão de 1:2 e

finalmente 10µL do inóculo. Também foram preparados controles positivos, nos quais foram adicionados 100 µL do caldo MH e 10 µL da suspensão bacteriana. Já nos controles negativos foram adicionados apenas 100 µL do caldo MH. As microplacas foram incubadas a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h e após o período verificadas quanto a turbidez. A CIM foi determinada por análise visual, comparando com o controle. Todas as etapas, teste e controles realizados em triplicata. Compreende-se como CIM, a menor concentração da curcumina que inibiu o crescimento visível da bactéria (PFFALER et al., 1995).

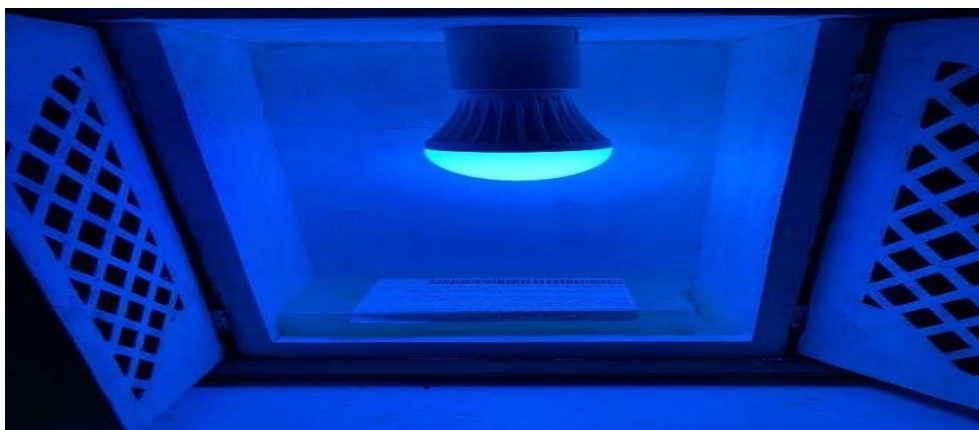
DETERMINAÇÃO DA CBM

Após a determinação da CIM, cada poço das microplacas recebeu 10µL da solução de resazurina 0,1%. Após 2 horas de incubação em temperatura ambiente (25 °C), verificou-se o surgimento de coloração rosa ou ausência de cor, indicando a morte de > 99,9% da cultura bacteriana, em relação à concentração de bactéria que estava presente nos poços no tempo zero (HAFIDH et al., 2011). Como controle positivo e negativo foi realizado idêntico ao descrito para o teste do CIM.

ENSAIOS DE FORMAÇÃO DO BIOFILME

Descrição do reator

Os ensaios foram realizados em uma caixa de madeira, preparada para esta finalidade, medindo 50 cm de altura x30cm de largura x30cm de comprimento, e com as paredes internas pintadas de branco. Na parte superior foi instalado um *spot* acoplado à uma lâmpada LED de alta frequência (A-60, G-light), 3W, 100-240v, luz RGB como mostra na Figura 1. Na parte inferior havia uma base para acoplar uma placa de Petri.

Figura 3 – Representação da caixa de madeira contendo o dispositivo LED.

Fonte: Autoria própria.

A distância da fonte luminosa até o suporte com a placa de Petri media 13 cm. Na placa estava dispensada 10 mL de solução salina contendo curcumina na CIM conhecida, juntamente com 1 mL do inóculo, preparado como descrito anteriormente. A energia luminosa emitida pela luz de LED (mW/cm^2), foi calculada empregando a fórmula descrita por Kumar et al. (2017):

$$P = 2\pi I_0 h^2 \times (1 - 1/\sqrt{(1+r/h)^2}) \quad \text{Eq. (1)}$$

Em que, I_0 – intensidade medida da luz (λ), r – raio da placa de Petri, h – altura da fonte luminosa ao centro da placa de Petri.

Ensaio *in vitro* de formação de biofilme

O ensaio foi realizado em triplicata pela técnica do cristal violeta, com adaptações à metodologia descrita por Balasubramanian et al. (2012) e Khare e Arora (2011). Em microtubos contendo 900 μL de caldo MH foram transferidos 100 μL do conteúdo da placa de Petri, nos seguintes intervalos de exposição à energia luminosa: 20, 40, 60 e 120 minutos. Após, os microtubos foram incubados por 48h a 29 ± 1 °C.

Após o período de incubação, o conteúdo dos microtubos foi transferido para novos microtubos previamente esterilizados para determinação das células planctônicas. Já as paredes dos microtubos empregados no teste, foram lavadas de 3 a 5 vezes com água de torneira, com intuito de remover qualquer célula remanescente não aderida, reservando-se posteriormente os tubos para secagem por 1h. Em seguida, em cada microtubo foi adicionado de 1 mL de solução do cristal violeta 1% e após 20 minutos, o

corante foi descartado e seu excesso nas paredes, removido com água de torneira. Uma vez seco, os microtubos foram adicionados de 1 mL de etanol absoluto e após um repouso por 30 minutos, a solução de cristal violeta-etanol teve absorbância determinada a $\lambda = 590$ nm (Quimis U2M). O controle do teste foi realizado sem adição de curcumina e exposição de luz (KUMAR et al., 2017).

Crítérios de interpretação

O percentual de adesão foi calculado pela fórmula (PAGANO et al., 2004):

$$[(ODC - ODT) \div ODC] \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

Em que, ODC – média da densidade óptica dos poços contendo o controle; ODT – média da densidade óptica de três poços do tratamento. A adesão foi classificada como forte ($\geq 80\%$), moderada (se ≥ 40 e $< 80\%$) ou fraca (se $< 40\%$) (RODRIGUES et al., 2010).

Para determinar o potencial de células capazes de formar biofilme, mesmo sob estresse, o valor da densidade óptica do meio, multiplicado por três, serviu como ponto de corte para a ODT determinada. Assim, todo valor acima do ponto de corte indicou presença de células viáveis, capazes de formar biofilme (PEIXOTO et al., 2015).

Quantificação das células planctônicas

O teste foi realizado em triplicata, pela determinação óptica do sobrenadante recolhido no ensaio *in vitro* da formação do biofilme (item 3.6.2). O volume de 500 μL do sobrenadante foi diluído em igual volume de solução salina 0,85% e posteriormente, a absorbância medida a 620 nm (CAWLEY et al., 2019). O controle do teste utilizou o crescimento sem adição da curcumina.

Expressão dos dados

Os resultados estão expressos pela média, mais ou menos o erro padrão.

4 RESULTADOS

Atividade da curcumina nas células planctônicas da *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416.

A Tabela 1 demonstra a determinação da CIM da curcumina sob a linhagem da *P. aeruginosa* UFPEDA 416, no período de 24 horas. Assim como a concentração bactericida mínima sob o mesmo período. O teste demonstrou atividade inibitória (CIM) à curcumina na concentração de 0,63 µg/mL, sem provocar efeito bactericida.

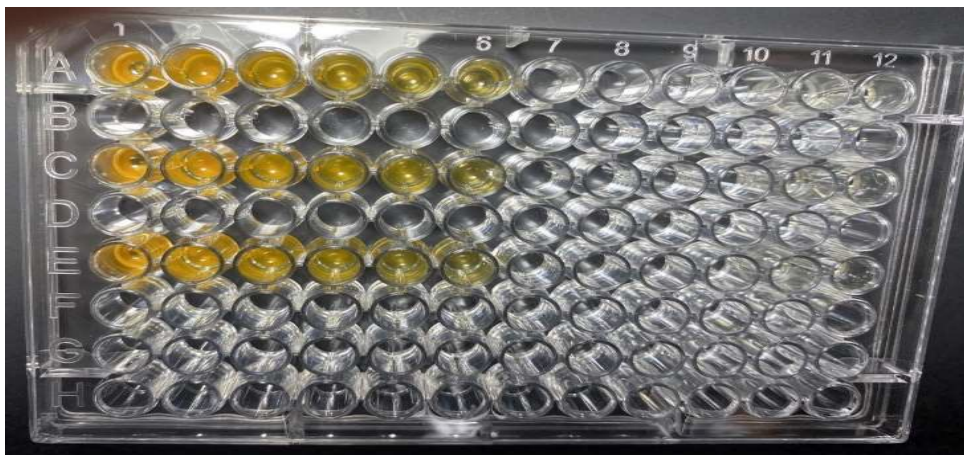
Tabela 1- Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da curcumina sobre *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416:

Concentração de curcumin (µg/mL)	UFPEDA 416	
	CIM	CBM
10,00	-	+
5,00	-	+
2,50	-	+
0,63	-	+
0,31	+	+
0,15	+	+
Controle	+	+

(+) indica viabilidade das células visualizada como turbidez no poço. (-) indica ausência de crescimento microbiano visível

As Figuras 4 e 5, apresentam as microplacas nos testes de determinação da CIM e CBM, respectivamente. A cor azul confirma a ação bacteriostática da curcumina, neste teste.

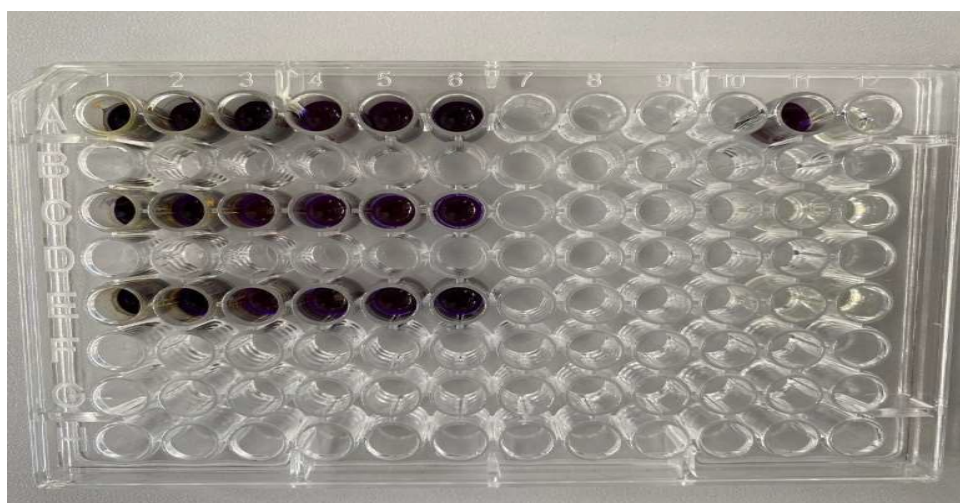
Figura 4 – CIM da curcumina em microplacas de 96 poços. Na Figura observa-se a presença de turbidez até o 4º poço, tendo este como a CIM do teste.



Poços nº 1 ao 6 (A, C e E) representando os testes e nº 11, 12 (A,C e E) representando os poços controles.

Fonte: Autoria própria.

Figura 5– Microplaca no teste de determinação da CBM (Concentração Bactericida Mínima). Os poços azuis representam que não houve morte celular.



Poços nº 1 ao 6 (A, C e E) contendo os testes e nº 11 12 (A,C e E) estão presentes os poços controles.

Fonte: Autoria própria.

Teste *in vitro* da formação do biofilme

A fonte de luz de LED emitiu uma energia de 28,03 mW/cm², produzindo um efeito sobre a formação do biofilme de *P. aeruginosa* UFPEDA 416 (Tabela 2). Foi observada uma redução na adesão de 40,8% nos primeiros 20 minutos, chegando a cerca de 11%, a partir de 60 minutos mantendo o valor até os 120 minutos.

O valor *cutoff* (ponto de corte) do ensaio foi de 2,129 (densidade óptica do meio = 0,710). Em todas as condições, havia células capazes de aderir à superfície, no entanto, a curcumina foi efetiva como fotossensibilizador, resultando uma adesão fraca da linhagem. Contudo, ao observar as densidades de células planctônicas, verificou-se que a redução na densidade de células foi menor, quando os valores da redução do biofilme estavam mais baixos, sugestivo de novo crescimento e que a ação da curcumina na concentração mínima inibitória foi maior sobre as formas sésseis do que para as formas planctônicas, confirmando o efeito bacteriostático do fotossensibilizador.

Tabela2 – Densidade ótica das células sésseis e planctônicas de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416 e seus percentuais de adesão (%ade) e redução (% red) frente a 0,63 µg/mL de curcumina em diferentes tempos de exposição à luz de LED ($\lambda=480$ nm).

T. e	20 min.	40 min.	60 min.	120 min.	Controle
Sésseis	0,741±0,074	0,870 ±0,091	1,109±0,069	1,107±0,003	1,250±0,012
% ade	40,8	30,4	11,1	11,4	100,0
Planctônicas	0,117±0,027	0,870±0,091	1,109±0,069	1,107±0,462	1,893±0,020
% red	93,8	54,0	41,4	41,5	0,0

T. e – tempo de exposição à luz de LED

5 DISCUSSÃO

Este trabalho verificou a eficácia da TFDa utilizando curcumina como fotossensibilizador, excitado por uma lâmpada de LED de alta frequência na faixa do espectro azul, contra a linhagem *P. aeruginosa* UFPEDA 416. A energia luminosa apresenta importante função no desenvolvimento e formação do biofilme disponibilizando calor, sendo fonte de energia além de auxiliar no processo de adesão das células (ALSANIUS et al., 2019). Determinados comprimentos de onda interferem de modo significativo no desenvolvimento dos biofilmes em formação, num comprimento médio de onda na faixa a partir de 470 nm, considerando-se também outras variáveis, tais como o tempo de exposição à luz, o microrganismo e o fotossensibilizador (ARAÚJO et al., 2017; PENHA et al. 2017).

Um dos principais mecanismos que permite as bactérias exibirem resistência aos antimicrobianos é a sua capacidade de formar biofilme (PAVÃO et al., 2021). O modo de vida bacteriano relacionado à formação de biofilmes está envolvido com mudanças dos processos fisiológicos desses microrganismos, isto é, mudando de um estilo de vida planctônica, propagando-se pelo ambiente, por uma vida fixando-se em superfícies em comunidades sésseis. Estima-se que cerca de 90% dos microrganismos estão organizados em biofilmes (HENRIQUES et al., 2013; CAUMO et al., 2010).

Visto que a *P. aeruginosa* é um microrganismo modelo no estudo sobre biofilmes microbianos, esta bactéria apresenta a capacidade de resistência antimicrobiana por vários mecanismos, tanto por um metabolismo altamente versátil, como por um genoma com capacidade de codificar diversos genes de resistência, incluindo para sistemas de efluxo (CAIXETA et al., 2019).

O emprego da energia luminosa se mostra eficaz no processo de inibição do crescimento de microrganismos, evidenciando a luz como um instrumento com propriedades antimicrobianas (KUMAR et al., 2016). A TFDa é uma técnica que explora a ação germicida da energia luminosa contra microrganismos resistentes a antibióticos. A aplicação terapêutica da energia luminosa era conhecida até mesmo por civilizações antigas e tem sido usada intuitivamente por muitos séculos (DANIELL; HILL, 1991).

Em 1900, o Dr. Oscar Raab observou o efeito tóxico do corante laranja de acridina contra *Paramecium* spp., iniciando uma série de experimentos com inativação fotodinâmica, marcando o início da história moderna da TFDa (ROSSIN et al., 2020). Depois de ser esquecido por muitas décadas, a TFDa emergiu como uma abordagem promissora para o tratamento antimicrobiano porque os microrganismos multirresistentes tornaram-se uma ameaça à saúde pública (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001).

A TFDa é baseada na ativação de fotossensibilizadores pela luz na presença de oxigênio molecular. Sob irradiação de luz adequada, há produção de oxigênio singlete por transferência de energia, bem como produção de compostos reativos de oxigênio, formada por transferência de elétrons. Esses compostos reativos de oxigênio reagem rapidamente com um amplo espectro de moléculas, incluindo aquelas encontradas na parede bacteriana e nos componentes da membrana, levando a danos celulares que, em última análise, levam à morte celular (LE GUERN et al., 2021). Além disso, a ação germicida do TFDa depende de uma combinação de quatro fatores: o tipo de fotossensibilizador, a fonte de energia luminosa, o comprimento de onda e o oxigênio exógeno (ARAÚJO et al., 2017).

A energia luminosa produzida pelas lâmpadas LED pode ser empregada com sucesso na TFDa porque sua eficácia é semelhante à outras fontes de luz mais caras (TAKAHASHI et al., 2014). O desenvolvimento de sistemas LED nas últimas décadas tem promovido seu uso como método seguro de desinfecção de alimentos e tratamento de água (PRASAD et al., 2020). Os sistemas de LED podem emitir comprimentos de onda que variam do ultravioleta ao infravermelho (PULLI et al., 2015), contudo, os sistemas de LED que emitem comprimentos de onda na faixa da luz visível, oferecem vantagens importantes, como segurança, consumo reduzido de energia e menor impacto ambiental (GORA et al., 2019).

Muitos corantes sintéticos podem ser usados como fotossensibilizadores na TFDa. Porém, nem todos os fotossensibilizadores demonstram o mesmo efeito fotodinâmico contra diferentes microrganismos (SORIA-LOZANO et al., 2015). A toxicidade e os danos ambientais relacionados a essas substâncias, no entanto, incentivam a busca por novos compostos (NUMAN et al., 2018). Os estudos evoluíram com a utilização de diversos fotossensibilizadores empregados na TFDa na área odontológica, isso torna-se necessário a investigação da TFDa por outras áreas principalmente, ambiental, cujo número de publicações ainda é baixo. O fotossensibilizador mais empregado nas pesquisas utilizando a TFDa é o azul de metileno, devido a diferentes concentrações do corante, Contraste com diversos comprimentos de onda e fonte de energia luminosa para ativação na célula, além de da diversidade de protocolos de tratamento (ETEMADI et al., 2021).

A utilização de substâncias bioativas e biodegradáveis de ocorrência natural é uma estratégia atrativa e uma tendência atual em termos de substituição de compostos sintéticos (GONÇALVES et al., 2021). Os pigmentos naturais são potenciais candidatos na FTDa (ISHIKAWA et al., 2010) e alguns estudos já foram realizados com clorofila (SUVOROV et al., 2021), índigo (ANDREAZZA et al., 2015) e curcumina (SANTEZI et al., 2021), entre outros.

O uso de luz LED na TFDa mediada por curcumina é um tópico emergente, mas ainda é pouco estudado. A área de uso que mais tem atraído interesse nos últimos anos tem sido a pesquisa odontológica (MÉNDEZ et al., 2019; ARAÚJO et al., 2017; LEE et al., 2017; PENHA et al., 2017). A fonte luminosa de LED é considerada de alta frequência quando é maior que 43 Hz e o controle do crescimento microbiano ocorre em nível molecular, promovendo inativando ou reduzindo a expressão de genes que coordenam a divisão celular (GOMES et al., 2020).

A atividade antimicrobiana da curcumina abrange um amplo espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A molécula age no crescimento bacteriano através de reações com oxigênio, interferindo na viabilidade de células planctônicas, bem como os mecanismos de formação de biofilmes (ZHENG et al., 2020). Dados preliminares sugerem que a atividade antibiofilme da curcumina ocorra via mecanismos de regulação de importantes operons responsáveis pela adesão celular a um determinado substrato (YANG et al., 2020).

A curcumina tem seu pico de absorção mais alto na faixa de luz azul (455-460 nm) e pode ser usado como um fotossensibilizador na faixa de 400-500 nm. Araújo et al. (2012) utilizando concentração de curcumina a 1,5 g/L e energia luminosa LED de luz azul (67 mW/cm², 450 nm, 20,1 J/cm²), mostraram diferença significativa entre a TFDa e a curcumina isolada. O emprego da TFDa reduziu o número de células significativamente. Em complemento, embora foi demonstrado grande sensibilidade de *A. hydrophila* ao fotossensibilizador, bactérias Gram-negativas foram menos suscetíveis à TFDa mediado por curcumina com sistemas LED do que bactérias Gram-positivas (PENHA et al. al., 2017). Os alvos celulares da terapia são a parede celular e os lipídios e proteínas da membrana citoplasmática. Como as bactérias Gram-negativas têm uma membrana externa complexa com duas camadas lipídicas que agem como uma barreira física e funcional entre as células e o ambiente, elas são menos sensíveis do que bactérias Gram-positivas, cujas paredes são grossas e têm maior porosidade e permeabilidade bacteriana.

Desse modo, o presente trabalho demonstrou que a concentração da curcumina de 10,0 µg/mL empregada em microdiluição em placa, na linhagem teste, foi bastante eficiente na inibição bacteriana chegando à concentração inibitória mínima de 0,63 µg/mL. Em contraste, estudos descritos por Lee et al (2017), compararam o efeito do extrato de *Curcuma xanthorrhiza* e a associação com curcumina nas concentrações de 10¹ a 10⁴ ng/ mL contra *Streptococcus mutans*. A concentração de 10⁴ ng/ mL dessa associação reduziu 76% da

viabilidade celular. Por outro lado, concentrações abaixo de 10^2 ng/ mL não demonstraram efeito.

Tonon et al. (2015) testaram três concentrações de curcumina (0,75; 1,5 e 3 mg/mL), irradiadas com 24, 48 e 72 J/cm² durante 100, 200 e 300 segundos, respectivamente a $\lambda = 450$ nm, contra diferentes linhagens de *Streptococcus mutans*. O estudo mostrou que reduções mais significativas variaram de cerca de 60-70% nas concentrações de 1,5 mg/mL irradiada com 48 e 72 J/cm².

Wu et al. (2016), avaliaram a atividade de três concentrações de curcumina (5, 10 e 20 μ M) contra *Vibrio parahaemolyticus* ($\lambda = 470$ nm, 3,6 J/cm² por 1 minuto). O estudo demonstrou que a curcumina na concentração de 10 μ M, reduziu o número de células em aproximadamente 6,5 unidades logarítmicas, enquanto todas as células foram inibidas na concentração de 20 μ M.

Penha et al. (2017) verificaram a atividade de 75 μ M de curcumina contra *P. aeruginosa* ATCC 27853 (UFPEA 416), *S. aureus* ATCC 25923, *A. hydrophila* ATCC 7966, *S. Typhimurium* ATCC 14028 e *E. coli* ATCC 25922 ($\lambda = 470$ nm, 139, 278 e 417 J/cm², respectivamente por 10, 20 e 30 minutos). O tratamento induziu uma redução significativa em todas as linhagens testadas, exceto *P. aeruginosa*. Por outro lado, *A. hydrophila* foi o bacilo mais sensível. A dose de 417 J/cm² foi a mais efetiva; entretanto, a redução celular foi dependente do tempo de exposição à energia luminosa, ou seja, 30 minutos de exposição produziu o melhor resultado. No presente estudo, a variável tempo apresentou resultado semelhante.

Mahdizade-Ari et al. (2019) usaram curcumina na concentração de 80 μ g/mL, expondo *P. aeruginosa* à luz de LED (600 mW, 445 nm, 100 Hz) e observaram que uma significativa do número de células viáveis. Já Araújo et al. (2017), testaram cinco concentrações da mistura de curcumina e curcuminóides em solução contra *S. mutans* e *L. acidophilus*: 0,75; 1,5; 3,0; 4,0 e 5,0 g/L ($\lambda = 450$ nm, 19 e 47,5 mW/cm²). A mistura apresentou toxicidade em todas as concentrações testadas, mas o melhor resultado foi obtido com potência de luz máxima e concentração de 47,5 mW/cm².

De acordo com Najafi et al. (2016), ao estudarem a associação de curcumina e clorexidina contra *A. actinomycetemcomitans*, observaram que o tratamento com 5 mg/mL de curcumina e clorexidina (CHX), empregando a LED de luz azul (400 mW/cm², 420-480 nm, 120 J/cm², 5 minutos), a curcumina exibiu uma CIM efetivamente maior em relação à CHX, maior que a associação do LED e ambas as moléculas, como também apenas a exposição à fonte luminosa.

Os resultados desse estudo para os ensaios *in vitro* da formação do biofilme demonstraram que houve redução progressiva da comunidade celular observado pelo percentual de adesão e redução como mostrada na (Tabela 2, página 25). Nos primeiros 20 minutos de irradiação com a luz de LED azul emitindo energia de 28,03 mW/cm² a $\lambda=480$ nm, o percentual de adesão foi de 40,8% caindo para 11,4 em até 120 minutos de exposição ao fotossensibilizador, caracterizando baixa adesão. Isto evidenciou uma perturbação nas células na capacidade de formar biofilme. Em complemento, para as células planctônicas, verificou-se menor redução da densidade de células, comparado com os valores de redução do biofilme, sugestivo da ação da curcumina na concentração mínima inibitória, teve mais ação sobre a capacidade de formar biofilme, por causar um efeito de estase e talvez morte celular, uma vez que a TFDa estava sendo testado. Ressalta-se que a forma séssil de *P. aeruginosa* pode resistir à concentrações inibitórias 100 vezes maiores de compostos antimicrobianos do que seu fenótipo planctônico (CAIXETA et al., 2019).

O processo de ligação do microrganismo à superfície sólida, formando biofilmes é complexo e regulado por diversos genes, da natureza hidrofóbica da superfície celular, além de características como substrato e meio de crescimento (DONLAN et al., 2002). A atividade da LED de alta potência quando empregada de forma que perturbe a comunidade do biofilme de *P. aeruginosa* provoca alterações moleculares podendo aumentar, diminuir ou até atuar na inibição da expressão de genes importantes nos processos de comunicação e manutenção celular (GRANDCLÉMENT et al., 2016).

P. aeruginosa tem extrema capacidade de se adaptar no meio, isso favorece sua persistência no ambiente e fortalece sua habilidade de formar biofilmes (LUJÁN et al., 2011). Além disso, *P. aeruginosa* apresenta um arsenal de fatores de virulência que permite sua flexibilidade facilitando a sua resposta contra diferentes estressores ambientais (QIN et al., 2022).

Nesse ponto de vista, a TFDa pode se tornar limitada quando aplicada em microrganismos que já são intrinsecamente resistentes especialmente quando não é empregada a fonte de luz correta, uma vez que as células microbianas irradiadas, têm a capacidade de reparação no DNA (LEE et al., 2015).

A perturbação da estabilidade dos biofilmes bem como a suscetibilidade das células planctônicas baseia-se não apenas na natureza e concentração do fotossensibilizador, mas também estão associadas a dois outros fatores principais. O primeiro é a intensidade da energia irradiada por uma fonte de luz LED; o segundo fator é o tempo de exposição do fotossensibilizador à dose (ANAS et al., 2021). Assim, em termos gerais, é muito discutível

se o melhor tempo de exposição pode ser estabelecido para um determinado comprimento de onda ao qual o fotossensibilizador é submetido, de modo que o tratamento possa estabelecer uma redução distinta na densidade celular.

Méndez et al. (2019) observaram as alterações na formação de biofilmes orais em 96h, utilizando 600 μM de curcumina previamente irradiada com luz LED azul ($\lambda = 455 \text{ nm}$, 75 J/cm^2 por 1, 2 e 5 minutos). Sem pré-tratamento, a curcumina afetou significativamente a vitalidade dos biofilmes de 72h em cerca de 45%. Irradiada por 2 e 5 minutos, a curcumina promoveu uma redução eficiente dos biofilmes de 72 para 96 horas, respectivamente. Para o melhor resultado, os autores estabeleceram o tempo de irradiação de 5 minutos.

O estágio de maturidade do biofilme é uma variável importante em termos da eficácia da curcumina na inibição e perturbação da formação e estabilidade dos biofilmes. Isso pode explicar a grande variação nos resultados entre estudos com diferentes espécies bacterianas (MÉNDEZ et al., 2019), bem como diferentes isolados de uma mesma espécie (TONON et al., 2015). Por outro lado, embora diferentes concentrações de curcumina tenham sido testadas, a eficácia foi alcançada em níveis muito baixos (LEE et al., 2017), o que parece ser uma grande vantagem e segurança.

Sreedhar et al. (2015) empregaram curcumina de 10 mg/g associada à luz azul (620 mW/cm^2 , 470 nm, 5 minutos) em diferentes bactérias e os resultados mostraram que quando aplicado vários tratamentos com tempo de pré-exposição de 5 minutos, as células reduziram às menores quantidades.

Saitawee et al. (2018) estudaram *A. actinomycetemcomitans* usando LED de luz azul (420-480 nm, 16,8 J/cm^2 , 1 minuto), realizando ensaios prévios sem tratamento por ativação com a luz, não mostrando redução significativa da contagem bacteriana. Ao utilizarem a luz azul em conjunto com a curcumina à 0,78 $\mu\text{g}/\text{mL}$, houve a redução total das células, indicando que a curcumina é um potente fotossensibilizador quando pré-exposto a luz azul. Contudo, este trabalho expôs ao mesmo tempo as células e o fotossensibilizador.

Lai et al., (2021) utilizaram um complexo curcumina- β -ciclodextrina (Cur- β -Cd) contra *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* demonstrando possuir efeitos antimicrobianos fotodinâmicos causando deformação celular, colapso da superfície e danos na estrutura celular das bactérias, resultando no vazamento de citoplasma, evidenciados por microscopia eletrônica de varredura.

A curcumina se mostra uma opção de escolha para uso na TPDa. Na literatura é nítida a dificuldade na escolha do fotossensibilizador ideal contra biofilmes. Visto que o sucesso desta terapia na inativação de biofilmes depende da penetração do FS no interior das células, mais

estudos devem ser conduzidos para melhor compreensão e avaliação da curcumina na função de FS.

Este trabalho foi desenvolvido durante a pandemia de covid-19, ainda em curso e disserta os resultados que puderam ser alcançados.

6 CONCLUSÃO

- ❖ O ensaio demonstrou atividade inibitória da curcumina sem causar efeito bactericida;
- ❖ Os resultados sugerem que para a obtenção de êxito no tratamento, seja necessária a combinação ideal, da fonte de energia luminosa, concentração do fotossensibilizador e tempo de exposição à luz;
- ❖ O tempo de exposição à fonte luminosa e o fotossensibilizador, reduziu o percentual de adesão, bem como a densidade de células planctônicas.

REFERENCIAS

ALBERTO, T.; CORBO, B. F. B.; MACINA, E. C. D.; LEITE, J. V.; INACIO, R. F. Efeitos do Diodo Emissor de Luz (LED) vermelho na estimulação de fibroblastos: ênfase na reparação tecidual. **Revista Intellectus**, n. 33, 2016.

ALSANIUS, B.W.; KARLSSON, M.; ROSBERG, A.K.; DORAIS, M.; NAZNIN, M.T.; KHALIL, S.; BERGSTRAND, K-J. Light and microbial lifestyle: the impact of light quality on plant-microbe interactions in horticultural production systems – A review. **Horticulturae**. v. 5, p. 41, 2019, doi: doi:10.3390/horticulturae5020041.

ANAS A., SOBHANAN J., SULFIYA K.M., SREELAKSHMI J.P.K., BIJU V. 2021. Advances in photodynamic antimicrobial chemotherapy. **J Photochem Photobiol C: Photochem Rev.** v. 49, p. 100452, 2021. doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2021.100452.

ANDREAZZA, N. L.; LOURENÇO, C. C.; STEFANELLO, M. E. A.; ATVARIS, T.D. Z.; SALVADOR, M. J. Photodynamic antimicrobial effects of bis-indole alkaloid indigo from *Indigo feratruxillensis* Kunth (Leguminosae). **Lasers Med Sci.** v. 30, p. 1315-1324. 2015.

ARAÚJO, N.C.; FONTANA, C. R.; GERBI, M. E.; BAGNATO, V. S. Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. **Fotomed Laser Surg.** v. 30, n. 2, p. 96-101, 2012. doi: 10.1089/pho.2011.3053.

ARAÚJO, N.C.; MENEZES, R. F.; CARNEIRO, V.S. M.; SANTOS-NETO, A.P.; FONTANA, C. R.; BAGNATO, V. S.; GERBI, M.E.M. Photodynamic inactivation of cariogenic pathogens using curcumin as photosensitizer. **Photomed Laser Surg.** v. 35, n. 5, p. 259-263, 2017.

BACELLAR, I. O. L.; TSUBONE, T. M.; PAVANI, C.; BAPTISTA, M.S. Photodynamic efficiency; from molecular photochemistry to cell death. **Int J Molec Sci.** v. 16, p. 20523-20559, 2015.

BAL, F. A.; OZKOCAK, I.; CADIRCI, B. H.; KARAARSLAN, E. S.; CAKDINLEYEN, M.; AGACCIOGLU, M. L. Effects of photodynamic therapy within do cyanine green on *Streptococcus mutans* biofilm. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** v. 26, p. 229-234, 2019.

BALASUBRAMANIAN, V.; NATARAJAN, K.; HEMAMBIKA, B.; RAMESH, N.; SUMATHI, C.S.; KOTTAIMUTHU, R.; RAJASH, K.V. High-density polyethylene (HDPE) degrading potential bacteria from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India. **Lett Appl Microbiol.** v. 51, p 205–211, 2010.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S.K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **J Pharmac Anal.** v. 6, n. 1, p. 71–79, 2016.

BARRETO, N. S. E.; FERNANDES V.R.H.S.; CAMPOS-TAKAKI, G, M.; Descoloração do corante têxtil alaranjado II usando um consórcio bacteriano. **Conexões Ciência e Tecnologia**, v. 1, n. 1, p. 29-34, 2007.

BERNARDO, S. P. C.; Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos e formação de biofilmes em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de água mineral. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2009.

BRANDWEIN, M; STEINBERG, D; MESHNER, S. Microbial biofilms and the human skin microbiome. **NPJ Biofilms Microbiomes**.v. 2, n. 1, p. 1-6, 2016.

CAIXETA, M. A.; BRAGA, A.; ALMEIDA, D.; PINTO, O.; SANTANA, E.; NAVES, P. Estudo da formação de biofilmes por *Pseudomonas aeruginosa*. **Enciclopédia Biosfera**. v. 16, n. 29, 2019.

CAUMO, K.; DUARTE M.; CARGNIN S.T.; RIBEIRO, V.B.; TASCA, T.; MACEDO, A. J.; Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar, **Revista Liberato**. v. 11. n. 16, p. 89-96, 2010.

CAWLEY, A.; GOLDING, S.; GOULSBRA, A.; HOPTROFF, M.; KUMARAN, S.; MARRIOTT, R. Microbiology insights into boosting salivary defenses through the use of enzymes and proteins. **J Dentistry**. v. 80, n. 1, p. 19–25, 2019.

COSTERTON, W.J.; WILSON, M. Introducing biofilms. **Biofilms**. v. 1, p. 1-4, 2004.

DANIELL M. D.; HILLS J. S. A history of photodynamic therapy. **Aus NZ J Surg**. v. 61, p. 340-348. 1991.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis**. v. 8, n. 9, p. 881, 2002. doi: 10.3201/eid08 09.020063.

EHRlich, G. D.; ARCIOLA, C. R. From Koch's postulates to biofilm theory. The lesson of Bill Costerton. **Int J Artif Organs**. v. 35, n. 10, p. 695-699, 2012.

ETEMADI, A., HAMIDAIN, M., PARKER, S., CHINIFORUSH, N. Blue light photodynamic therapy with curcumin and riboflavin in the management of periodontitis: a systematic review. **J Lasers Med Sci**. v. 12, p. e15, 2021, doi: 10.34172/jlms.2021.15.

FARHOOD B.; MORTEZAEI K.; GORADEL N. H.; KHANLARKHANI N.; SALEHI E.; NASHTAEI M. S.; SAHEBKAR, A. Curcumin as an anti-inflammatory agent: Implications to radiotherapy and chemotherapy. **J Cell Physiol**. V. 234, n. 5, p. 5728-5740, 2019.

FERREIRA, J. A. B. Diversidade genética, perfil de resistência aos antimicrobianos e produção de biofilme de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas da água utilizada em unidades de terapia renal substitutiva. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2009

GALIE, S.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, C.; MIGUÉLEZ, E. M.; VILLAR, C. J.; LOMBÓ, F. Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. **Front Microbiol.** v. 9, p. 898, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.00898.

GHANBARI, A.; DEHGHANY, J.; SCHWEBS, T.; MÜSKEN, M.; HÄUSSLER, S.; HERMANN, M. M. Inoculation density and nutrient level determine the formation of mushroom-shaped structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Sci Rep.** v. 6, p. 32097, 2016, doi: 10.1038/srep32097.

GHOLAMI, S.; TABATABAEI, M.; SOHRABI, N. Comparison of biofilm formation and antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* in humans and environment isolates. **Microb Pathogen.** v. 109, p. 94-98, 2017.

GOMES, V.T.; PADILHA, I.Q.M.; AMARAL, I.P.G.; VASCONCELOS, U. Assessment of high-power LED in the adhesion of wild *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Res J Pharm Biol Chem Sci.** v. 11, n. 6, p. 75-82, 2020.

GORA, S. L.; RAUCH, K. D.; ONTIVEROS, C. C.; STODDART, A. K.; GAGNON, G. A. Inactivation of biofilm-bound *Pseudomonas aeruginosa* bacteria using UVC light emitting diodes. **Water Res.** v. 15, n. 151, p. 193-202, 2019.

GONÇALVES, T.; OLIVEIRA, B.T. M.; VASCONCELOS, U. Uso de piocianina no tingimento de fibra de algodão. **Int J Develop Res.** v. 11, n. 2, p. 44127-44134. 2021.

GRANDCLÉMENT, C.; TANNIÈRES, M.; MORÉRA, S.; DESSAUX, Y.; FAURE, D. **FEMS Microbiol Rev.** Quorum quenching: role in nature and applied developments. v. 40, n. 1, p. 86-116, 2016.

GUO, Y.; ROGEL, J. S.; ZHANG, P. Rose Bengal-decorated silica nanoparticles as photosensitizers for inactivation of gram-positive bacteria. **Nanotechnology.** v. 21, n. 6, p. 65- 102, 2010.

HAFIDH, R. R; ABDULAMIR, A. S; VERN, L. S; BAKAR, F. A; ABAS, F; JAHANSHIRI, F; SEKAMI, Z. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **Open Microbiol J.** v. 5, p. 98-106, 2011.

HAKIMIHA, N.; KHOEI, F.; BAHADOR, A.; FEKRAZAD, R. The susceptibility of *Streptococcus mutans* to antibacterial photodynamic therapy: a comparison of two different photosensitizers and light sources. **J Appl Oral Sci.** v. 22, n. 2. p. 80-84. 2014.

HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Curr Opinion Microbiol.** v.33, p. 67-73, 2016.

HENRIQUES, A.; VASCONCELOS, C.; CERCA, N. A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais- o estado da arte. **Arquivos de medicina.** v. 27, n. 1, p. 27-36, 2013.

HØIBY, N.; A short history of microbial biofilms and biofilm infections. **J Pathol Microbiol Immunol.** v. 125, n. 4, p. 272-275, 2017.

HU, Y.; HE, C.; JIANG, C.; LIAO, H.; XIONG, H.; ZHAO, Q. Complexation with whey protein fibrils and chitosan: A potential vehicle for curcumin with improved aqueous dispersion stability and enhanced antioxidant activity. **Food Hydrocolloids.** v. 104, p. 105-729.2020

- ISHIKAWA, S. I.; SUZUKI, K.; ARIHARA, K.; YAMAMOTO, Y.; MUKAI, T.; ITOH, M. Photodynamic antimicrobial activity of avian eggshell pigments. **FEBS Letters**. v. 584, n. 4, p. 770-774. 2010.
- JOE, B.; VIJAYKUMAR, M.; LOKESH, B. R. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. **Crit Rev Food Sci Nutr**. v. 44, n. 2, p. 97-111, 2004.
- KHALID, E. B.; AYMAN, E. E.; RAHMAN, H.; ABDELKARIM, G.; NAJDA, A. Natural products against cancer angiogenesis. **Tumor Biol**. v. 37, n. 11, p. 14513–14536. 2016.
- KHARE, E.; ARORA, N. K. Dual activity of pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic against phytopathogen and signal molecule for biofilm development by rhizobia. **Can J Microbiol**. v. 57, n. 9, p. 708-713, 2011.
- KOKARE, C. R.; CHAKRABORTY, S.; KHOPADE, A. N.; MAHADIK, K. R. Biofilm: Importance and applications. **Ind J Biotechnol**. v. 8, p. 159-168. 2009.
- KOTHA, R. R.; LUTHRIA, D. L. Curcumin: biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. **Molecules**, v. 24, n. 16, p. 2930, 2019.
- KUMAR, A.; GHATE, V.; KIM, M.; ZHOU, W.; KHOO, G. H.; YUK, H. Inactivation and changes in metabolic profile of selected food borne bacteria by 460 nm LED illumination. **Food Microbiol**. v. 63, p. 12-21, 2017.
- LAI, D.; ZHOU, A.; TAN, B.K.; TANG, Y.; HAMZAH, S.S.; ZHANG, Z.; LIN, S.; HU, J. Preparation and photodynamic bactericidal effects of curcumin- β -cyclodextrin complex. **Food Chem**. v. 361, p. 130117, 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130117.
- LE GUERN, F.; OUK, T. S.; YERZHAN, I.; NURLYKYZ, Y.; ANOUX, F.; FROCHOT, C.; LEROY-LHEZ, S.; SOL, V. Photophysical and bactericidal properties of pyridinium and imidazolium porphyrins for photodynamic antimicrobial chemotherapy. **Molecules**. v. 26, n. 4, p. 1122, 2021.
- LEE, H. J.; KANG, S. M.; JEONG, S. H.; CHUNG, K. H.; KIM, B. I. Antibacterial photodynamic therapy with curcumin and Curcuma xanthorrhiza extract against Streptococcus mutans. **Photodiagnosis Photodyn Ther**. v. 20, p. 116-119. 2017.
- LEE, O-M.; KIM, H.Y.; PARK, W.; KIM, T.H.; YU, S. A comparative study of disinfection efficiency and regrowth control of microorganism in secondary wastewater effluent using UV, ozone, and ionizing irradiation process. **J Hazard Mater**. v. 295, n. 15, p. 201-208, 2015.
- LEONEL, L. C.; CARVALHO, M. L.; SILVA, B. M.; ZAMUNER, S.; ALBERTO, S. C.; COSTA, M.S. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) using methylene blue inhibits the viability of the biofilm produced by *Candida albicans*. **Photodiagnosis Photodyn Ther**. v. 26, p. 316-323. 2019.

LUJÁN, A.M.; MACIÁ, M.D.; YANG, L.; MOLIN, S.; OLIVIER, A.; SMANIA, A.M. Evolution and adaptation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms driven by mismatch repair system-deficient mutators. **Plos One**. v. 6, n. 11, p. e27842, doi: 10.1371/journal.pone.0027842.

MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **J Porphyrins Phthalocyanines**. v. 5, p. 105-129. 2001.

MAHDIZADE-ARI, M.; POURHAJIBAGHER, M.; BAHADOR, A. Changes of microbial cell survival, metabolic activity, efflux capacity, and quorum sensing ability of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* due to antimicrobial photodynamic therapy-induced bystander effects. **Photodiagnosis Photodyn Ther**. v. 26, p. 287-294, 2019; doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.04.021.

MAIA, A. A.; CANTISANI, M.L.; ESPOSTO, E.M.; SILVA, W.C.P.; RODRIGUES, E. C. P.; RODRIGUES, D. P.; LÁZARO, N. S. Antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from fish and poultry products. **Food Sci technol**. v. 29, n. 1, p. 114-119, 2009.

MANOLOVA, Y.; DENEVA, V.; ANTONOV, L.; DRAKALSKA, E.; MOMEKOVA, D.; LAMBO, V. N. The effect of the water on the curcumin tautomerism: A quantitative approach. **Spectrochimica Acta A: Molec Biomolec Spectroscopy**. v. 132, p. 815-820.2014.

MÉNDEZ, D. A. C.; GUTIERREZ, E.; LAMARQUE, G. C. C.; RIZZATO, V. L.; BUZALAF, M. A. R.; MACHADO, M. A. A. M.; CRUVINEL, T. The effectiveness of curcumin-mediated antimicrobial photodynamic therapy depends on pre-irradiation and biofilm growth times. **Photodiagnosis Photodyn Ther**. v. 27, p. 474-480, 2019.

MIELKO, K. A.; JABLOŃSKI, S. J.; MILCZEWSKA, J.; SANDS, D.; LUKASZEWICZ, M.; MLYNARZ, P. Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. **World J Microbiol Biotechnol**. v. 35, n. 11, p. 178, 2019. doi: 10.1007/s11274-019-2739-1.

MENOITA, E.; SANTOS, V.; TESTAS, C.; GOMES, C.; SANTOS, A. S. biofilms: knowing the entity. **J Aging Innov**. v. 1, n. 3, p. 23-32, 2012.

MOGHADAMTOUSI, S. Z.; KADIR, H. A.; HASSANDARVISH, P.; TAJIK, H.; ABUBAKAR, S.; ZANDI, K. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. **BioMed Res Int**. v. 2014, p. 186864, 2014, 10.1155/2014/186864.

NAJAFI, S.; KHAYAMZADEH, M.; PAKNEJAD, M.; POURSEPANJ, G.; KHARAZI, FARD M. J.; BAHADOR, A. An *in vitro* comparison of antimicrobial effects of curcumin-based photodynamic therapy and chlorhexidine, on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **J Lasers Med Sci**. v. 7, n. 1, p. 21-25, 2016, doi: 10.1517/jlms.2016.05.

NUMAN, M.; BASHIR, S.; MUMTAZ, R.; TAYYAB, S.; REHMAN, N. U.; KHAN, A.L.; SHINWARI, Z. K.; AL-HARRASI, A. Therapeutic applications of bacterial pigments: a review of current status and future opportunities. **3 Biotech**. v. 8, n. 4, p. 207, 2018. doi: 10.1007/s13205-018-1227-x.

OLIVEIRA, I. N. D.; RAMOS, J. A.; SILVA, W. L.; CHAVES, V. D.; MELO, C. A. Estudo das propriedades do Diodo Emissor de Luz (LED) para a determinação da constante de Planck numa maquete automatizada com o auxílio da plataforma Arduíno. **Rev Bras Ens Física**, v. 42, 2019.

PAGANO, P. J.; BUCHANAN, L. V.; DAILEY, C. H.; HAAS, J. H.; VAN ENK, R. A.; GIBSON, J.K. Effects of linezolid on staphylococcal adherence versus time of treatment. **Int J Antimicrob Agents**. v. 23, n. 3, p. 226-234, 2004.

PAVÃO, D.; MORAES, F. C.; RIBEIRO, B. L. M.; COSTA, F. G. R.; CAMARA, M. B. P. Capacity for biofilm formation by bacterial strains and antibiofilm action of *Lafoensia pacari* (Lythraceae) extract. **Revista Fitos**. v. 15, n. 2, p. 153-165, 2021.

PENHA, C. B.; BONIN, E.; SILVA, A. F.; HIOKA, N.; ZANQUETA, E. B.; NAKAMURA, T. U.; MIKCHA, J. M. G. Photodynamic inactivation of foodborne and food spoilage bacteria by curcumin. **Food Sci Technol**. v. 76, p. 198-202. 2017.

PEIXOTO, M. M.; GRESSLER, L. T.; SUTILI, F. J.; COSTA, M. M.; VARGAS, A. C. Ação dos desinfetantes sobre a adesão e biofilme consolidado de *Staphylococcus* spp. **Pesq Vet Bras**. v. 35, p. 105-109, 2015.

PERUSSI, J. R.; IMASATO, H.; BAGNATO, V. S. **Inativação fotodinâmica de microrganismos. Novas técnicas ópticas para área da saúde**. São Paulo: Livraria da Física; p. 161-84, 2008.

PETRINI, M.; TRENTINI, P.; TRIPODI, D.; SPOTO, G.; D'ERCOLE, S. *In vitro* antimicrobial activity of LED irradiation on *Pseudomonas aeruginosa*. **J Photochem Photobiol Biol**. v. 168, p. 25-29, 2017, doi:10.1016/j.jphotobiol.2017.01.020.

PFFALER, M. A.; MESSER, S. A.; COFFMANN, S. Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870. **J Clin Microbiol**. v. 33, n. 5, p. 1094-1097, 1995.

PINHATI, F. R.; DEL AGUILA, E. M.; TÔRRES, A. P. R.; SOUSA, M. P. D.; SANTIAGO, V. M. J.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. Avaliação da eficiência de eficiência de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias provenientes de estação de tratamento de efluente de refinaria de petróleo. **Química Nova**, v. 37, p. 1269-1274, 2014.

PISANI, J.R.; TONUCCI, L. R. S.; INNOCENTINI, M. D. M.; Inativação de pseudomonas aeruginosa em resíduos de serviços de saúde por micro-ondas. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 13, n. 3, p. 284-290, 2008.

PRASAD, A.; DU, L.; ZUBAIR, M.; SUBEDI, S.; ULLAH, A.; ROOPESH, M. S. Applications of Light-Emitting Diodes (LEDs) in food processing and water treatment. **Food Eng Rev**. v. 12, p. 269-289, 2020, doi: 10.1007/s12393-020-09221-4.

PULLI, T.; DÖNSBERG, T.; POIKONEN, T.; MANOOKERI, F.; KÄRHÄ, P.; IKONEN, E. Advantages of white LED lamps and new detector technology in photometry. **Light Sci Appl.** n. 4, n. 9, p. 332. 2015, doi: 10.1038/lssa.2015.105.

QIN, S.; XIAO, W.; ZHOU, C.; PU, Q.; DENG, X.; LAN, L.; LIANG, H.; SONG, X.; WU, M. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. **Signal Transduct Target Ther.** v. 7, n. 1, p. 199, 2022, doi: 10.1038/s41392-022-01056-1.

RODRIGUES, L.B.; SANTOS, L.R.; TAGLIARI, V.Z.; RIZZO, N. N.; TRENHAGO, G.; OLIVEIRA, A.P.; GOETZ, F.; NASCIMENTO, V.P. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. **Braz J Microbiol.** v. 41, p. 1082-1085. 2010.

RODRIGUES, A. V. F. Phenotypic profiling of several strains of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of potential virulence determinants. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho. Braga, Portugal, p. 76. 2014.

ROLIM, J. P.; MELO, M. A.; GUEDES, S. F.; ALBUQUERQUE, F. F. B.; SOUZA, J. R.; NOGUEIRA, N. A.; ZANIN, I.C. J.; RODRIGUES, L. K. A. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. **J Photochem Photobiol B.** v. 106, p. 40-46, 2012.

ROSSIN, A.R. S.; OLIVEIRA, E. L.; MORAES, F.A. P.; SILVA, J. R. C.; SCHEIDT, D. T.; CAETANO, W.; HIOKA, N.; DRAGUNSKI, D.C. Photodynamic therapy in electrospinning: review of techniques and applications. **Quím Nova.** v. 43, n. 5, p. 613-622. 2020.

SAITAWEE, D.; TEERAKAPONG, A.; MORALES, N. P.; JITPRASERTWONG, P.; HORMDEE, D. Photodynamic therapy of Curcuma longa extract stimulated with blue light against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** v. 22, p. 101-105, 2018, doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.03.001.

SANTEZI, C.; REINA, B. D.; ANNUNZIOI, S. R.; CALIXTO, G.; CHORILLI, M.; DOVIGO, L.N. Photodynamic potential of curcumin in bioadhesive formulations: Optical characteristics and antimicrobial effect against biofilms. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** v. 35, p. 102-116. 2021.

SANTOS, I. D. A. L.; NOGUEIRA, J. M. D. R.; MENDONÇA, F. C. R. Mecanismos de resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*. **RBAC.** v. 47, n. 1-2, p. 5-12, 2015.

SHARMA, G.R.A.O.S.; BANSAL, A.; DANG, S.; GUPTA, S.; GABRANI, R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. **Biologicals.** v. 42, n. 1, p. 1-7, 2014.

SORIA-LOZANO, P.; GILABERTE, Y.; PAZ-CRISTOBAL, M. P.; PÉREZ-ARTIAGA, L.; LAMPAYA-PÉREZ, V.; APORTA, J.; PÉREZ-LAGUNA, V.; GARCÍA-LUQUE, I.; REVILLO, M. J.; REZUSTA, A. *In vitro* effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. **BMC Microbiology**, v. 15, p. 187. 2015

SPRING, B. Q.; RIZVI, I.; XU, N.; HASAN, T.; The role of photodynamic therapy in overcoming cancer drug resistance. **Photochem Photobiol Sci.** v. 14, n. 8, p. 1476-1491, 2015.

SREEDHAR, A.; SARKAR, I.; RAJAN, P.; PAI, J.; MALAGI, S.; KAMATH, V. Comparative evaluation of the efficacy of curcumin gel with and without photo activation as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: A split mouth clinical and microbiological study. **J Nat Sci Biol Med.** v. 6, s. 1, p. s102-s109, 2015, doi: 10.4103/0976-9668.166100.

STREETER, K.; KATOULI, M. *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their pathogenes is and prevalence in clinical settings and the environment. **Infectol Epidemiol Med Winter.** v. 2, n. 1, p. 25-32. 2016.

SUETH-SANTIAGO, V.; MENDES-SILVA, G. P.; DECOTÉ-RICARDO, D.; LIMA, M.E.F.D. Curcumina, o pó dourado do açafrão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Quím Nova.**v. 3, n. 4, p. 538-552, 2015.

SUVOROV, N.; POGORILY, Y. V.; DIACHKOVA, E.; VASIL'EV, Y.; MIRONOV, A.; GRIN, M. Derivatives of natural chlorophylls as agents for antimicrobial photodynamic therapy. **Int J Molec Sci.** v. 22, n. 12, p. 6392, 2021.

TAKAHASHI, H.; NAKAJIMA, S.; OGASAWARA, K.; ASANO, R.; NAKAE, Y.; SAKATA, I.; IIZUKA, H. Photodynamic therapy using a novel irradiation source, LED lamp, is similarly effective to photodynamic therapy using diode laser or metal-halide lamp on DMBA- and TPA-induced mouse skin papillomas. **J Dermatol.** v. 41, n. 8, p. 729-731.2014.

TOMEH, M. A.; HADIANAMREI, R.; ZHAO, X. A review of curcumin and its derivatives as anticancer agents. **Int J Molec Sci.** v. 20, n. 5. p. 1033.2019.

TONON, C. C.; PASCHOAL, M. A.; CORREIA, M.; SPOLIDÓRIO, D. M.; BAGNATO V. S.; GIUSTI, J. S.; SANTOS-PINTO, L. Comparative effects of photodynamic therapy mediated by curcumin on standard and clinical isolate of *Streptococcus mutans*. **J Contemp Dent Pract.** v. 16, n. 1, p. 1-6, 2015, doi: 10.5005/jp-journals-10024-1626.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato,** v. 14, n. 22, p. 113-238, 2014.

WU, J.; MOU, H.; XUE, C.; LEUNG, A. W.; XU, C.; TANG, Q. J. Photodynamic effect of curcumin on *Vibrio parahaemolyticus*. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** v. 15, p. 34-39. 2016.

YANG, Y.; MA, S.; XIE, Y.; WANG, M.; CAI, T.; LI, J.; SHI, C. Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by 405-nanometer-light-emitting diode illumination. **Appl Environ Microbiol.** v. 86, n. 10, p. 20-92, 2020.

ZHENG, D.; HUANG, C.; HUANG, H.; ZHAO, Y.; KHAN, M. R. U.; ZHAO, H.; HUANG, L. antibacterial mechanism of curcumin: a review. **Chem Biodiversity.** v. 17, n. e200171, 2020, 10.1002/cbdv.202000171.

Curcumin-mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT): a systematic review

Quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT) mediada por curcumina: uma revisão sistemática

DOI:10.34119/bjhrv4n6-201

Recebimento dos originais: 08/10/2021

Aceitação para publicação: 23/11/2021

Eduardo Cândido da Silva

Biomédico, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, Cidade Universitária, CEP – 58051-900, João Pessoa-PB, Brasil
E-mail: eduardobiomedicina19@outlook.com

Ulrich Vasconcelos

Doutor em Engenharia de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da UFRJ
Professor no Departamento de Biotecnologia da UFPB
Endereço: Laboratório de Microbiologia Ambiental, CBIotec, Universidade Federal da Paraíba – Campus I, R. Ipê Amarelo s/n, CEP – 58051-900, João Pessoa-PB
E-mail: u.vasconcelos@cbiotec.ufpb.br

ABSTRACT

Light energy is known to be used to combat microbial growth. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) has the potential to use different naturally-occurring compounds, such as photosensitizers. Curcumin is an example of a molecule of interest in different areas under different optics. This systematic review surveys the aims and scope of research on curcumin-mediated PACT published between January 2011 and December 2020. The search was carried out in MEDLINE, PubMed, EMBASE and Periódicos CAPES databases employing the keywords “Photodynamic antimicrobial chemotherapy”, “photosensitizer”, “curcumin” and the descriptor “Light-Emitting Diode”. It was observed that in the last decade little material meeting these criteria was published. Brazilian institutions concentrated most of their studies on cytotoxic activity. The most recent work, however, focused on antibiofilm activity. Gram-positive bacteria are more sensitive to curcumin-mediated PACT over a short wavelength range. Different concentrations and exposure time of the photosensitizer were evaluated, but the amount of information is still insufficient to establish the best treatment condition as the number of tested pathogens is still poor.

Keywords: Photodynamic inactivation, naturally occurring photosensitizers, curcumin, LED system.

RESUMO

A energia luminosa pode ser empregada no combate ao crescimento microbiano e a quimioterapia antimicrobiana fotodinâmica (PACT) tem o potencial de utilizar diferentes compostos naturais como fotossensibilizadores. A curcumina é um exemplo de molécula em ascensão em diferentes áreas sob diferentes ópticas. Este trabalho de revisão

sistemática visou elencar objetivos e escopos de pesquisas sobre a PACT mediada pela curcumina considerando o período entre janeiro de 2011 e dezembro de 2020. A busca foi realizada em bases de dados MEDLINE, PubMed, EMBASE e Periódicos capes, nas quais utilizou-se as palavras-chave “Quimioterapia antimicrobiana fotodinâmica”, “fotossensibilizador”, “curcumina” e o descritor “Light-Emitting Diode”. Se observou que na última década pouco material foi publicado e instituições brasileiras concentraram a maioria dos estudos, focados na atividade citotóxica. Entretanto, a atividade antibiofilme foi escopo do trabalho mais recente. Bactérias Gram-positivas são mais sensíveis à PACT mediada pela curcumina, numa pequena faixa de comprimento de onda. Diferentes concentrações e tempo de exposição do fotossensibilizador foram avaliados, mas os dados ainda são insuficientes para se estabelecer a melhor condição do tratamento porque o número de patógenos testados ainda é pouco.

Palavras-chave: Inativação fotodinâmica, fotossintetizadores naturais, curcumina, sistemas de LED.

1 INTRODUCTION

Light exhibits antimicrobial properties (Kumar et al., 2016). Antimicrobial photodynamic chemotherapy (PACT) is a technique that exploits the germicidal action of light energy against antibiotic resistant microbes (Collin et al., 2020). The therapeutic application of light energy was known even to ancient civilizations and has been used intuitively for many centuries (Daniell and Hill, 1991). In 1900, Dr. Oscar Raab observed the toxic effect of acridine orange dye against *Paramecium* spp., initiating a series of experiments with photodynamic inactivation, marking the beginning of the modern history of PACT (Rossin et al., 2020). After being forgotten for many decades, PACT has emerged as a promising approach to antimicrobial treatment because multi-drug resistant microbes have become a public health threat (Macdonald and Dougherty, 2001).

PACT is based on the activation of photosensitizers by light in the presence of molecular oxygen. Under appropriate light irradiation, there is production of singlet oxygen by energy transfer, as well as production of reactive oxygen compounds, formed by electron transfer. These reactive oxygen compounds react rapidly with a wide spectrum of molecules, including those found in the bacterial wall and membrane components, leading to cell damage which ultimately leads to cell death (Le Guern et al., 2021). Additionally, the germicidal action of PACT depends on a combination of four factors: the type of photosensitizer, the light energy source, the wavelength and exogenous oxygen (Araújo et al., 2017).

The light energy produced by LED lamps can be successfully employed in PACT because its effectiveness is similar to other more expensive light sources (Takahashi et al., 2014). The development of LED systems in recent decades has promoted their use as

a safe method of food disinfection and water treatment (Prasad et al., 2020). LED systems can emit wavelengths ranging from ultraviolet up to infrared (Pulli et al., 2015); LED systems that emit wavelengths in the visible light range, however, offer important advantages, such as safety, reduced consumption of energy and less environmental impact (Gora et al., 2019).

Not all photosensitizers demonstrate the same photodynamic effect against different microbes (Soria-Lozano et al., 2015). Many synthetic dyes can be used as photosensitizers in PACT, such as toluidine blue (Hakimiha et al., 2014), eosin (Rolim et al., 2012), methylene blue (Leonel et al., 2019), rose bengal (Guo et al., 2010) and malachite green (Bal et al., 2019). The toxicity and environmental damage related to these substances, however, encourages the search for new compounds (Numan et al., 2018). The use of naturally occurring bioactive and biodegradable substances is an attractive strategy and a current trend in terms of replacing synthetic compounds (Gonçalves et al., 2021). Natural pigments are potential candidates in PACT (Ishikawa et al., 2010) and some studies have already been carried out with chlorophyll (Suvorov et al., 2021), indigo (Andreazza et al., 2015) and curcumin (Santezi et al., 2021), among others.

Curcumin is a bioactive pigment obtained from *Curcumin longa* L. (Rodrigues et al., 2020) and has different herbal properties (Salehi et al., 2019), which include anti-inflammatory (Farhood et al., 2019), antitumor (Khalid et al., 2016) antioxidant (Hu et al., 2020), neuroprotective (Tomeh et al., 2019) and antimicrobial (Moghadamtousi et al., 2014) activities. The present work reviews the use of curcumin as a photosensitizer in PACT, using light energy emitted by LED lamps at visible light wavelengths.

2 MATERIAL AND METHODS

Four databases were consulted: MEDLINE, PubMed, Scielo and Periódicos CAPES. These were chosen because are indicated as the methodological guidelines for the preparation of systematic reviews and meta-analysis by the Ministry of Health of Brazil (2012). The research took place separately on each platform in January 2021, covering publications from January 1st, 2011 to December 31st, 2020. The keywords "Photodynamic antimicrobial chemotherapy", "photosensitizer" and "curcumin" were used as found in any part of the text. As a second filter, the descriptor "Light-Emitting Diode" was used. Only original open access articles published in English were selected. Review articles of any kind, technical notes, editorials, books, theses, abstracts, articles in press and original articles without access were excluded. Duplicate documents in the

searched databases were also excluded. The documents were analyzed and summarized through the construction of a table, in which the aims and results of each study was identified.

3 RESULTS

Initially, 22 documents were identified; after applying the exclusion criteria, the number was reduced to six. The articles were published between 2015 and 2019. A total of five documents addressed the cytotoxic effect of curcumin-mediated PACT using LED lamps with bacterial planktonic cells (Araújo et al., 2017; Penha et al., 2017; Lee et al., 2017; Wu et al., 2016 and Tonon et al., 2015). The remaining work reported on the effectiveness of curcumin-mediated LED light on the stability of biofilms (Méndez et al., 2019).

Most studies were concentrated in South America, followed by Asia, with Brazil being the leading country (67%) and all publications had women as first authors. No publications meeting our criteria were identified from Africa, Europe or Oceania. Regarding the scope of publications, the areas of concentration of studies were Dentistry and Food Science.

Most studies evaluated the activity of curcumin against eight distinct species: *Aeromonas hydrophila* (Penha et al., 2017), *Escherichia coli* (Penha et al., 2017), *Lactobacillus acidophilus* (Araújo et al., 2017), *Pseudomonas aeruginosa* (Penha et al., 2017), *Salmonella Typhimurium* (Penha et al., 2017), *Staphylococcus aureus* (Penha et al., 2017), *Streptococcus mutans* (Araújo et al., 2017, Lee et al., 2017, Tonon et al., 2017, Tonon et al., 2017), 2015) and *Vibrio parahaemolyticus* (Wu et al., 2016). Only one study evaluated the action of irradiated curcumin on the formation of oral bacterial biofilms, without distinguishing the species (Méndez et al., 2019).

Curcumin activity was evaluated against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The studies indicated that the choice of this molecule as a LED lamp-activated photosensitizer could be preferentially indicated against *S. mutans* and *S. aureus*. Table 1 summarizes the results of these studies.

Table 1. Summary of studies on curcumin-mediated PACT using LED systems at visible light spectrum (2015-2019)

Aims	Results	Reference
To test three concentrations (0.75; 1.5 and 3 mg/mL), irradiated with 24, 48 and 72 J/cm ² during 100, 200 and 300 seconds, respectively, (λ = 450 nm) against different strains of <i>S. mutans</i> .	The most significant reductions ranged from about 60-70% at a concentration of 1.5 mg/mL irradiated with 48 and 72 J/cm ² .	Tonon et al. (2015)
To evaluate the activity of three concentrations (5, 10 and 20 μ M) against <i>V. parahaemolyticus</i> (λ = 470 nm, 3.6 J/cm ² for 1 minute).	A very significant effect was observed at the concentration of 10 μ M by a reduction in the number of cells by approximately 6.5 log units. All cells were inhibited at 20 μ M.	Wu et al. (2016)
To assess the activity of 75 μ M against <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966, <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 and <i>E. coli</i> ATCC 25922 (λ = 470 nm, 139, 278 and 417 J/cm ² , respectively for 10, 20 and 30 minutes).	Treatment induced a significant reduction in all strains tested except for <i>P. aeruginosa</i> . On the other hand, <i>A. hydrophila</i> was the most sensitive rod. The dose of 417 J/cm ² was the most effective; however, cell reduction was dependent on the time of exposure to light energy; 30 minutes exposure produced the best result.	Penha et al. (2017)
To test five concentrations of the mixture of curcumin and curcuminoids in solution against <i>S. mutans</i> and <i>L. acidophilus</i> : 0.75; 1.5; 3.0; 4.0 and 5.0 g/L (λ = 450 nm, 19 and 47.5 mW/cm ² , respectively, for 5 and 2 minutes).	Curcumin showed toxicity at all concentrations tested, but the best result was obtained with maximum light power and concentration tested.	Araújo et al. (2017)
To compare the effect of <i>Curcuma xanthorrhiza</i> extract and the association of the extract with concentrations of 10 ⁰ to 10 ⁴ ng/mL of curcumin against <i>S. mutans</i> (λ = 405 nm, 25.3 J/cm ² , 300 seconds).	The association of curcumin 10 ⁴ ng/mL with the plant extract reduced cell viability by 76%. Concentrations below 10 ² ng/ml had no effect.	Lee et al., (2017)
To verify the changes in the formation of oral biofilms within 96h, using 600 μ M of curcumin previously irradiated with blue LED light (λ = 455 nm, 75 J/cm ² for 1, 2 and 5 minutes).	Without pretreatment, curcumin significantly affected the vitality of 72h biofilms by about 45%. Irradiated for 2 and 5 minutes, curcumin promoted an efficient reduction of biofilms from 72 to 96 hours, respectively. For the best result, the authors adopted the irradiation time of 5 minutes.	Méndez et al. (2019)

Curcumin concentrations in these studies varied considerably. Three documents expressed the solutions as a mass/volume ratio, in the order from 1 ng/mL to 5 g/L, with activity observed at both 100 ng/mL and the highest concentration tested. On the other hand, the other three studies expressed curcumin concentrations as a mass/mol/volume ratio, ranging from 5 to 600 μ M, with activity observed from 10 μ M.

Four working ranges between wavelengths ranging from 405 to 470 nm were used, representing an intensity strength from 1.2 to 60 J/s/m². The exposure time of the photosensitizer to the dose ranged between 2 and 30 minutes. Efficacy, however, was a

function of several things: the concentration of the photosensitizer, the intensity of the strength of the light source and the time of exposure to the dose.

4 DISCUSSION

Curcumin, IUPAC 1,6-heptadiene-3,5-diene-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl), is a naturally-occurring yellow pigment with bioactive properties reported even before the 1st century AD (Sueth-Santiago et al., 2015). Curcumin belongs to the group of curcuminoids and is a tautomer found in enol and keto forms (Manolova et al., 2014). The molecule is also the major compound of the crude extract of the root of *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) (Li et al., 2011).

The use of LED light in curcumin-mediated PACT is an emerging topic, but its use is still rare and poorly understood. The area for its use that has attracted the most interest in recent years has been dental research (Méndez et al., 2019; Araújo et al., 2017; Lee et al., 2017; Penha et al., 2017). The antimicrobial property of curcumin encompasses a broad spectrum of Gram-positive and Gram-negative bacteria. The molecule acts on bacterial growth through reactions with oxygen, interfering with the viability of planktonic cells, as well as the mechanisms of biofilm formation (Zheng et al., 2020). Preliminary data suggested that the antibiofilm activity of curcumin occurs via downregulation mechanisms of important operons responsible for cell attachment to a given substrate (Yang et al., 2020).

Disturbance of the vitality of biofilms, as well as the susceptibility of planktonic cells is based not only on the nature and concentration of the photosensitizer but also associated with two other main factors. The first is the intensity of the energy radiated by the LED light source; the second factor is the exposure time of the photosensitizer to the dose (Anas et al., 2021). Thus, in general terms, it is very debatable whether the best exposure time can be established for a given wavelength to which the photosensitizer is submitted, so that the treatment can establish a distinct reduction in cell density.

In addition, alongside extracellular matrix constituents, the stage of biofilm maturity is an important variable in terms of the effectiveness of curcumin in inhibiting and disturbing the formation and stability of biofilms. This may explain the wide variation in results between studies with different bacterial species (Méndez et al., 2019), as well as different strains of the same species (Tonon et al., 2015). Additionally, although different concentrations of curcumin were tested, effectiveness was achieved at very low levels (Lee et al., 2017), which seems to be a great advantage.

Curcumin has its highest absorption peak in the blue light range (455-460 nm) and can be used as a photosensitizer at 400-500 nm range. Although great sensitivity of *A. hydrophila* to the photosensitizer has been demonstrated, Gram-negative bacteria were less susceptible to curcumin-mediated PACT with LED systems than Gram-positive bacteria. The cellular targets of therapy are the cell wall and cytoplasmic membrane. Because Gram-negative bacteria have a complex outer membrane with two lipid layers that act as a physical and functional barrier between cells and the environment, they are less sensitive than Gram-positive, whose walls are thick and have greater porosity and permeability (Penha et al. al., 2017).

Although, in light of the aims and criteria established in this systematic review, few articles on the subject were revealed, it was observed that the application of curcumin as a photosensitizer is a topic of interest, especially with regard to the understanding of cytotoxicity. Furthermore, the use of curcumin in PACT is an emerging issue, given that only one article was published between 2010 and 2015 (Tonon et al., 2015). On the other hand, since then, the number of publications has increased significantly. Their leading theme has been to seek for an understanding of the photosensitizer in the evaluation of biofilm stability, especially of representative members of the oral microbiota.

5 CONCLUSION

The use of curcumin as a photosensitizer in PACT is a recent topic and over the last decade different bacteria have been tested for susceptibility, attracting the interest of dental researchers and the food industry. Brazil has led in the number of publications on the subject with new research directions bringing to light the effect of curcumin-mediated PACT for understanding of the mechanisms of inhibition of biofilm formation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to UFPB and the Graduate Program in Cellular and Molecular Biology. The English text of this paper has been revised by Sidney Pratt, Canadian, MAT (The Johns Hopkins University), RSAdip - TESL (Cambridge University).

REFERENCES

- Anas A., Sobhanan J., Sulfiya K.M., Sreelakshmi J.P.K., Biju V. 2021. Advances in photodynamic antimicrobial chemotherapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 49: 100452, doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2021.100452.
- Andreazza N.L., de Lourenço C.C., Stefanello M.E.A., Atvars T.D.Z., and Salvador M.J. 2015. Photodynamic antimicrobial effects of bis-indole alkaloid indigo from *Indigofera truxillensis* Kunth (Leguminosae). *Lasers in Medical Science* 30: 1315-1324.
- Araújo N.C., de Menezes R.F., Carneiro V.S.M., dos Santos-Neto A.P., Fontana C.R., Bagnato V.S., and Gerbi M.E.M. 2017. Photodynamic inactivation of cariogenic pathogens using curcumin as photosensitizer. *Photomedicine and Laser Surgery* 35(5): 259-263.
- Bal F.A., Ozkocak I., Cadirci B.H., Karaarslan E.S., Cakdinleyen M., and Agaccioglu M.L. 2019. Effects of photodynamic therapy with indocyanine green on *Streptococcus mutans* biofilm. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 26: 229-234.
- Daniell M.D., and Hills J.S. 1991. A history of photodynamic therapy. *The Australia and New Zealand Journal of Surgery* 61: 340-348.
- Farhood B., Mortezaee K., Goradel N.H., Khanlarkhani N., Salehi E., Nashtaei M.S., and Sahebkar A. 2019. Curcumin as an anti-inflammatory agent: Implications to radiotherapy and chemotherapy. *Journal of Cellular Physiology* 234(5): 5728-5740.
- Gonçalves T., Oliveira B.T.M., and Vasconcelos U. 2021. Uso de piocianina no tingimento de fibra de algodão. *International Journal of Development Research* 11(2): 44127-44134.
- Gora S.L., Rauch K.D., Ontiveros C.C., Stoddart A.K., and Gagnon G.A. Inactivation of biofilm-bound *Pseudomonas aeruginosa* bacteria using UVC light emitting diodes. *Water Research* v. 151, p. 193-202, 2019.
- Guo Y., Rogelj S., and Zhang P. 2010. Rose Bengal-decorated silica nanoparticles as photosensitizers for inactivation of gram-positive bacteria. *Nanotechnology* 21(6):065102.
- Hakimiha N., Khoei F., Bahador A., and Fekrazad R. 2014. The susceptibility of *Streptococcus mutans* to antibacterial photodynamic therapy: a comparison of two different photosensitizers and light sources. *Journal of Applied Oral Science* 22(2): 80-84.
- Hu Y., He C., Jiang C., Liao H., Xiong H., Zhao Q. 2020. Complexation with whey protein fibrils and chitosan: A potential vehicle for curcumin with improved aqueous dispersion stability and enhanced antioxidant activity. *Food Hydrocolloids* 104: 105729.
- Ishikawa S-I., Suzuki K., Arihara K., Yamamoto Y., Mukai T., and Itoh M. 2010. Photodynamic antimicrobial activity of avian eggshell pigments. *FEBS Letters* 584(4): 770-774.

- Khalid E.B, Ayman E.E., Rahman H., Abdelkarim G., and Najda A. 2016. Natural products against cancer angiogenesis. *Tumor Biology* 37(11): 14513–14536.
- Lee H-J., Lee H.J., Kang S.M., Jeong S.H., Chung K.H., and Kim B.I. 2017. Antibacterial photodynamic therapy with curcumin and *Curcuma xanthorrhiza* extract against *Streptococcus mutans*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 20: 116-119.
- Le Guern F., Ouk T-S., Yerzhan I., Nurlykyz Y., Anoux F., Frochet C., Leroy-Lhez S., and Sol V. 2021. Photophysical and bactericidal properties of pyridinium and imidazolium porphyrins for photodynamic antimicrobial chemotherapy. *Molecules* 26(4): 1122.
- Leonel L.C., Carvalho M.L., da Silva B.M., Zamuner S., Alberto-Silva C., and Costa M.S. 2019. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) using methylene blue inhibits the viability of the biofilm produced by *Candida albicans*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 26: 316-323.
- Li S., Yuan W., Deng G., Wang P., Yang P., and Aggarwal B.B. 2011. Chemical composition and product quality control of turmeric (*Curcuma longa* L.). *Pharmaceutical Crops* 2: 28-54.
- Kumar A., Ghate V., Kim M.J., Zhou W., Khoo G.H., and Yuk, H.G. 2016. Antibacterial efficacy of 405, 460 and 520 nm light emitting diodes on *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied Microbiology* 120: 49–56.
- Macdonald I.J., and Dougherty T.J. 2001. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 5: 105-129.
- Manolova Y., Deneva V., Antonov L., Drakalska E., Momekova D., and Lambov N. 2014. The effect of the water on the curcumin tautomerism: A quantitative approach. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 132: 815-820.
- Méndez D.A.C., Gutierrez E., Lamarque G.C.C., Rizzato V.L., Buzalaf M.A.R, Machado M.A.A.M., and Cruvinel T. 2019. The effectiveness of curcumin-mediated antimicrobial photodynamic therapy depends on pre-irradiation and biofilm growth times. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 27: 474-480.
- Ministério da Saúde. Diretrizes metodológicas: elaboração de revisão sistemática e metanálise de ensaios clínicos randomizados. (2012) Ministério da Saúde, Brasília, Brasil, pp. 13-92.
- Moghadamtousi S.Z., Kadir H.A., Hassandarvish P., Tajik H., Abubakar S., and Zandi K. 2014. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *BioMed Research International* 2014: 186864.
- Numan M., Bashir S., Mumtaz R., Tayyab S., Rehman N.U., Khan A.L., Shinwari Z.K., and Al-Harrasi A. 2018. Therapeutic applications of bacterial pigments: a review of current status and future opportunities. *3Biotech* 8: 207.

Penha C.B., Bonin E., Silva A.F., Hioka N., Zanqueta E.B., Nakamura T.U., and Mikcha J.M.G. 2017. Photodynamic inactivation of foodborne and food spoilage bacteria by curcumin. *LWT-Food Science and Technology* 76: 198-202.

Prasad A., Du L., Zubair M., Subedi S., Ullah A., and Roopesh M.S. 2020. Applications of Light-Emitting Diodes (LEDs) in food processing and water treatment *Food Engineering Reviews* 12: 269-289.

Pulli T., Dönsberg T., Poikonen T., Manookeri F., Kärhä P., and Ikonen E. 2015. Advantages of white LED lamps and new detector technology in photometry. *Light Science and Applications* 4: e332.

Rodrigues A.S., de Oliveira D.R., Lima C.L.S., Holanda M.O., Barboza A.A.A., Canabrava N.V., Lima A.T.A., Lira S.M. 2020. Beneficial effects of the use of *Curcuma longa* L. in oncological treatment: A review. *Braz J Health Rev* 3: 6579-6591.

Rolim J.P., De-Melo M.A., Guedes S.F., Albuquerque-Filho F.B., De Souza J.R., Nogueira N.A., Zanin I.C.J., and Rodrigues L.K.A. 2012. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 106:40-46.

Rossin A.R.S., Oliveira E.L., Moraes F.A.P., Da Silva Junior R.C., Scheidt D.T., Caetano W., Hioka N., and Dragunski D.C. 2020. Photodynamic therapy in electrospinning: review of techniques and applications. *Química Nova* 43(5): 613-622.

Santezi C., Reina B.D., De Annunzio S.R., Calixto G., Chorilli M., and Dovigo L.N. 2021. Photodynamic potential of curcumin in bioadhesive formulations: Optical characteristics and antimicrobial effect against biofilms. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 35: p. 102-416.

Salehi B., Stojanović-Radić Z., Matejić J., Sharifi-Rad M., Kumar N.V.A., Martins N., and Sharifi-Rad J. 2019. The therapeutic potential of curcumin: A review of clinical trials. *European Journal of Medicinal Chemistry* 163: 527-545.

Soria-Lozano P., Gilaberte Y., Paz-Cristobal M.P., Pérez-Artiaga L., Lampaya-Pérez V., Aporta J., Pérez-Laguna V., García-Luque I., Revillo M.J., and Rezusta A. 2015. In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. *BMC Microbiology* 15: 187.

Sueth-Santiago V., Mendes-Silva G.P., Decoté-Ricardo D., and Lima, M.E.F.D. 2015. Curcumina, o pó dourado do açafrão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. *Química Nova* 38(4): 538-552.

Suvorov N., Pogorilyy V., Diachkova E., Vasil'ev Y., Mironov A., and Grin M. 2021. Derivatives of natural chlorophylls as agents for antimicrobial photodynamic therapy. *International Journal of Molecular Science* 22(12): 6392.

Takahashi H., Nakajima S., Ogasawara K., Asano R., Nakae Y., Sakata I., and Iizuka H. 2014. Photodynamic therapy using a novel irradiation source, LED lamp, is similarly effective to photodynamic therapy using diode laser or metal-halide lamp on DMBA- and TPA-induced mouse skin papillomas. *Journal of Dermatology* 41(8): 729-731.

Tomeh M.A., Hadianamrei R., and Zhao, X. 2019. A review of curcumin and its derivatives as anticancer agents. *International Journal of Molecular Sciences* 20(5): 1033.

Tonon C.C., Paschoal M.A., Correia M., Spolidório D.M., Bagnato V.S., Giusti J.S., and Santos-Pinto L. 2015. Comparative effects of photodynamic therapy mediated by curcumin on standard and clinical isolate of *Streptococcus mutans*. *The Journal of Contemporary Dental Practice* v. 16, p. 1-6, 2015.

Wu J., Mou H., Xue C., Leung A.W., Xu C., and Tang Q.J. 2016. Photodynamic effect of curcumin on *Vibrio parahaemolyticus*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 15: 34-39.

Yang Y., Ma S., Xie Y., Wang M., Cai T., Li J., and Shi C. 2020. Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by 405-nanometer-light-emitting diode illumination. *Applied and Environmental Microbiology* 86(10): 20-92.

Zheng D., Huang C., Huang H., Zhao Y., Khan M.R.U., Zhao H., and Huang L. 2020. Antibacterial mechanism of curcumin: A review. *Chemistry & Biodiversity* 17(8): 171-200.