

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO DO
CENTRO OESTE

CYNTHIA SUZYELLEN ALBUQUERQUE CAIRES

AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA EM *S. aureus*, *E. coli* E *P. aeruginosa* UTILIZANDO OS FOTOSSENSIBILIZADORES EOSINA AZUL DE METILENO E METALO-CLOROFILINA

CYNTHIA SUZYELLEN ALBUQUERQUE CAIRES

AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA EM *S. aureus*, *E. coli* E *P. aeruginosa* UTILIZANDO OS FOTOSSENSIBILIZADORES EOSINA AZUL DE METILENO E METALO-CLOROFILINA

Dissertação apresentada como pré-requisito para obtenção de título de mestre pelo Programa de Pós-Graduação Saúde e Desenvolvimento da Região Centro Oeste sobre orientação do Prof. Dr. Valter Aragão do Nascimento.

CYNTHIA SUZYELLEN ALBUQUERQUE CAIRES

AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA EM *S. aureus*, *E. coli* E *P. aeruginosa*
UTILIZANDO OS FOTOSSENSIBILIZADORES EOSINA AZUL DE METILENO E
METALO-CLOROFILINA

Dissertação apresentada como pré-requisito
para obtenção de título de mestre pelo
Programa de Pós-Graduação Saúde e
Desenvolvimento da Região Centro Oeste
sobre orientação do Prof. Dr. Valter Aragão
do Nascimento

Resultado _____

Campo Grande-MS, _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Valter Aragão do Nascimento

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

Prof^o. Dr. Bruno Spolon Marangoni

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

Prof^a. Dr. Marilene Rodrigues Chang

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

Dedico este trabalho a minha mãe Isabel
Cristina Gonçalves que sempre foi uma fonte de
inspiração para que eu continuasse sempre estudando.

Ao meu marido Anderson Rodrigues Lima
Caires pelo apoio incondicional, e que propiciou as
condições para que eu pudesse concluir este trabalho.

E as minhas filhas, Sophia Albuquerque Lima
Caires e Lívia Albuquerque Lima Caires que são a
razão do meu viver.

Agradecimentos

Aos meus avós Messias Gonçalves e Edna Nunes Gonçalves que junto com minha mãe me deram toda a bagagem para ser quem eu sou hoje, muito obrigada por tudo.

Ao meu irmão Braulio H. Albuquerque que sempre torceu por mim e mesmo de longe sempre esteve por perto.

As minhas filhas Sophia e Lívia que podem nem ter entendido bem os momentos de correria, pois apesar de tentar me desdobrar em mil às vezes fiquei ausente, enfim, espero que um dia possam entender que isto também foi por vocês.

Ao meu marido Anderson Rodrigues Lima Caires, meu grande companheiro com quem compartilhei dúvidas e aflições, participando ativamente de todo o projeto, e que teve muita paciência e compreensão nos momentos de maior dificuldade, sem você não seria possível.

A minha sogra Valdecilva Lima Andrade que sempre me ajudou, vindo de Nova Andradina para cuidar das minhas filhas para que eu pudesse estudar, muito obrigada.

Aos meus compadres Adecilva Lima Negreli e Euclides Negreli que abriram as portas da sua casa quando eu ainda morava em Dourados.

Ao meu orientador Valter Aragão do Nascimento que prontamente incorporou a ideia do projeto, e propiciou as condições necessárias para que ele fosse realizado, obrigada pela confiança.

A Prof^a Cassia R B Leal que abraçou nosso projeto dedicando grande parte do seu tempo e conhecimento, minha grande parceira nessa jornada, muito obrigada pela sua paciência.

Ao Prof^o Carlos Ramos que prontamente nos cedeu espaço no seu laboratório sendo grande colaborador deste projeto.

As alunas Alessandra Ramos Lima, Luciana Piovezan e Cícera Maria da Silva que deram os primeiros passos no grupo do PDT facilitando a minha caminhada. Em especial a minha companheira de bobó Alessandra me ajudando e compartilhando minhas aflições durante a execução do projeto.

Aos residentes Michelli Lopez e Lair Covizzi e a técnica do laboratório de bacteriologia Lucia Terezinha Restel da Silva pela grande ajuda no laboratório.

Ao Esmael e ao Marcelo que foram os responsáveis por montar o sistema de iluminação.

Ao programa de pós-graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste que propiciou a execução do projeto de mestrado.

A todos do Grupo de óptica e fotônica que me receberam tão bem, e que de alguma maneira participaram deste projeto.

Você nunca sabe que resultados virão da
sua ação. Mas se você não fizer nada,
não existirão resultados.

Mahatma Gandhi

RESUMO

O presente estudo avaliou a potencial aplicação da clorofilina cúprica de sódio (CuChlNa) e da eosina azul de metileno segundo Giemsa (EAM) como fotossensibilizador (FS) antimicrobiano para as bactérias *S. aureus* (Gram-positiva), *P. aeruginosa* e *E. coli* (Gram-negativas). Os resultados demonstram que tanto a EAM quanto CuChlNa foram capazes de fotoinativar a *S. Aureus*. Os dados mostram que o EAM e CuChlNa apresentam efeito de fotoinativação similares para *S. aureus* inibindo seu crescimento completamente nas concentrações de 5µM, quando as amostras foram previamente incubadas por 30 min e irradiadas com uma dose de energia de 30 J/cm² em 625 nm. Entretanto, somente o EAM foi efetivo para inativar a *E. coli*, para isso, uma configuração experimental mais complexa foi necessária para fotoinativação. No caso da *E. coli.*, para o crescimento bacteriano ser totalmente inibido foi necessário um período de incubação do fotossensibilizador de 120 min e uma concentração mínima de 20 µM. Por fim, destaco que nenhum dos fotossensibilizadores foi capaz de inativar *P. aeruginosa* em diversas condições experimentais testadas.

Palavras-chave: Fotoinativação, bactérias, eosina azul de metileno, clorofilina cúprica de sódio.

ABSTRACT

The present study evaluated the potential use of sodium copper chlorophyllin salt (CuChlNa) and eosin methylene-blue according to Giemsa (EMB) as antimicrobial photosensitizers (aPS) for photoinactivation (PDI) of *Staphylococcus aureus* (Gram-positive) *P. aeruginosa* and *Escherichia coli* (Gram-negative) bacteria. The results revealed that both EMB and CuChlNa can be used as aPS for the photoinactivation of *S. aureus* while only EMB was able to photoinactivate *E. coli*. Nevertheless, a more complex experimental setup was needed for obtaining the photoinactivation against *E. coli*. On contrary, none of the photosensitizers was effective for *P. aeruginosa* under several tested experimental conditions. The data showed that EMB and CuChlNa presented similar photoinactivation effect on *S. aureus* in which the bacterial growth was completely inhibited at PS concentrations over 5 μM , previously incubated during 30 min, when irradiated by a light dose of 30/J cm^2 at 625nm. In the case of *E. coli*, the bacterial growth was completely inhibited only when combining a PS incubation period of 120 min with concentrations over 20 μM .

Keywords: Photoinactivation; bacteria; eosin methylene-blue; sodium-copper chlorophyllin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA	5-ácido aminolevulínico
AM	Azul de Metileno
AT	Azul de Toluidina
ATCC	Coleção de microorganismos Norte Americana, do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
cm	Centímetro
CMH	Caldo Muller Hinton
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAM	Eosina Azul de Metileno
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>E. coli</i> êntero-hemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
EUA	Estados Unidos da América
FS	Fotossensibilizador
h	Hora
IC ₅₀	Concentração de droga que inibiu o crescimento celular em 50%
IPM	Imipenem
IFD	Inativação Fotodinâmica
LED	Diodo emissor de luz do inglês <i>Light Emitting Diode</i>
Laser	amplificação da luz por emissão estimulada de radiação do inglês <i>light amplification by stimulated emission of radiation</i>
Min	Minutos
MRSA	<i>S. aureus</i> resistente a metilina
MYSTIC	Do inglês <i>Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection</i>
PCA	Agar padrão para contagem do inglês <i>Plate count agar</i>
QA	Queratose Actínica
RGB	Vermelho/Verde/Azul do inglês <i>Red/Green/Blue</i>
rpm	Rotações por minuto

SENTRY	Do inglês <i>Antimicrobial Surveillance Program</i>
TFD	Terapia fotodinâmica
UV-Vis	Ultravioleta-visível
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UFC	Unidades formadoras de colônias
UTIs	Unidades de Terapia Intensiva
VRSA	<i>S. aureus</i> resistente à vancomicina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
C+	Controle Positivo
Chl	Clorofila
CuChlNa	Clorofilina cúprica de sódio
mg	Miligramas
mW	Miliwatts
mWcm ⁻²	MiliWatts por centímetro quadrado
Na	Sódio
O ₂	Oxigênio molecular
¹ O ₂	Oxigênio singleto
•O ₂ ⁻	Superóxido
•OH	Radical hidroxila
¹ PS*	Estado excitado singleto
¹ PS	Estado fundamental singleto
³ PS*	Estado tripleto excitado
μL	Microlitros
μm	Micrômetros
μM	Micromolar
%	Porcentagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia das bactérias.....	19
Figura 2 - Diferenças estruturais da parede das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	20
Figura 3 - Imagem da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>	22
Figura 4 - Imagem da bactéria <i>Escherichia coli</i>	23
Figura 5 - Imagem da bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
Figura 6 - Linha do tempo demonstrando a inserção dos antibióticos e o aparecimento de resistência.....	26
Figura 7 - Projeção do avanço dos microrganismos resistentes a antibióticos.....	27
Figura 8 - Diagrama de Jablonski Simplificado.....	29
Figura 9 - Espectro da radiação eletromagnética.....	30
Figura 10 - Linha do tempo da descoberta de antibióticos e fotoantimicrobianos.....	33
Figura 11 - Estrutura química da clorofila a e b.....	35
Figura 12 - Estrutura Química da Clorofilina de sódio-cúprico.....	36
Figura 13 - Estrutura química do Corante Giemsa.....	37
Figura 14 - Imagem do Sistema de LED de irradiação.....	44
Figura 15 - Imagem do Sistema LED durante operação irradiando uma microplaca.....	44
Figura 16 - Espectro de Absorção CuChlNa e EAM na concentração 20 µM diluído em água destilada.....	45
Figura 17 - Curva de inibição do crescimento em células NIH-3T3 utilizando EAM.....	46
Figura 18 - Curva de inibição do crescimento em células NIH-3T3 utilizando CuChlNa.....	47
Figura 19 - Curva de inibição do crescimento em células NIH-3T3 utilizando AM.....	48

Figura 20 - Unidades formadoras de colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> em função da concentração de EAM.....	49
Figura 21 - Imagem das placas de Petri contendo as unidades formadoras de colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> para as diferentes concentração de EAM.....	50
Figura 22 - Imagem das placas de Petri contendo as unidades formadoras de colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> para as diferentes concentração de EAM.....	50
Figura 23 - Unidades formadoras de colônias de <i>Escherichia coli</i> em função da concentração de EAM.....	51
Figura 24 - Imagem das placas de Petri contendo as unidades formadoras de colônias de <i>Escherichia coli</i> para as diferentes concentração de EAM.....	52
Figura 25 - Imagem das placas de Petri contendo as unidades formadoras de colônias de <i>Escherichia coli</i> para as diferentes concentração de EAM.....	52
Figura 26 - Unidades formadoras de colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> em função da concentração de CuChlNa.....	53
Figura 27 - Imagem das placas de Petri contendo as unidades formadoras de colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> para as diferentes concentração de CuChlNa.....	54
Figura 28 - Imagem das placas de Petri contendo as unidades formadoras de colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> para as diferentes concentração de CuChlNa.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela. 1. Citotoxicidade de Corantes na linhagem celular NIH-3T3.....	48
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Microrganismos Bacterianos	19
2.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.1.3 <i>Escherichia coli</i>	22
2.1.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
2.1.5 <u>Resistência Bacteriana aos Antibióticos</u>	25
2.2 Terapia fotodinâmica (TFD)	27
2.2.1 <u>Laser versus LED</u>	31
2.2.2 <u>Resistência a IFD</u>	31
2.3 Fotossensibilizadores	32
2.3.1 <u>História dos fotossensibilizadores</u>	32
2.3.2 <u>Clorofilina de sódio-cúprico</u>	34
2.3.3 <u>Eosina azul de metileno tipo Giemsa</u>	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo Geral	38
3.2 Objetivos Específicos	38
4 METODOLOGIA	39
4.1 Corantes	39
4.1.1 <u>Preparação dos corantes</u>	39
4.2 Medidas de Absorção Óptica	39
4.3 Citotoxicidade dos Fotossensibilizadores	39

4.3.1 <u>Ensaio de citotoxicidade</u>	40
4.3.2 <u>Interpretação das análises de citotoxicidade</u>	41
4.4 Bactérias	41
4.5 Ensaio Biológicos	41
4.6 Determinação da Inibição Bacteriana	42
4.6.1 <u>Testes Adicionais</u>	43
4.6.2 <u>Análise dos testes de Inibição do crescimento bacteriano</u>	43
4.7 Equipamentos	43
4.7.1 <u>Sistema LED (homemade)</u>	43
5 RESULTADOS	45
5.1 Janela Terapêutica	45
5.2 Citotoxicidade	46
5.3 Inibição do Crescimento Bacteriano	49
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 INTRODUÇÃO

Muita coisa mudou desde o descobrimento da penicilina na década de 1920 e seu efetivo uso em 1942. Hoje é difícil imaginar procedimentos cirúrgicos, transplantes, quimioterapia e o cuidado de pacientes críticos sem a utilização de antibióticos. Entramos em uma fase que para o paciente infectado por bactérias multirresistentes, é como se voltássemos à era do pré-antibiótico (ARIAS; MURRAY, 2009; RUNCIE, 2015).

Um dos maiores problemas globais do século 21 são infecções por bactérias resistentes a antibióticos, o que antes era restrito apenas aos hospitais, e a pacientes imunocomprometidos, agora se apresenta também, em outros ambientes. O uso inapropriado e indiscriminado de antibióticos utilizados nos ambulatórios, nos hospitais e pela indústria alimentícia fez com que as bactérias desenvolvessem resistência a várias classes de antibióticos, criando bactérias multirresistentes (ALANIS, 2005).

Uma das espécies mais comumente associadas às doenças humanas é *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), que é considerado mais prevalente e também o mais virulento, causando intoxicação alimentar, infecções cutâneas, pneumonia, dentre outros (MURRAY, 2009). Podemos destacar também, a bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*), da família da enterobactérias, e que está presente na microbiota intestinal, porém é capaz de causar gastroenterites. A *E. coli* é o bacilo Gram-negativo mais comumente encontrado em pacientes com sepse e infecções hospitalares (MURRAY, 2009). Outra bactéria de grande importância clínica é a *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), que é uma bactéria Gram-negativa, oportunista e de difícil tratamento. Sua importância decorre da sua capacidade de sobreviver em diferentes condições e sua múltipla resistência a antibióticos. Neste sentido faz-se necessário mais estudos de inviabilização destas bactérias, sendo uma alternativa a inativação fotodinâmica (HASHIMOTO, 2009; NEVES, 2011).

A terapia fotodinâmica (TFD) foi inicialmente usada para o tratamento contra o câncer, (DOLMANS, 2003). Entretanto trabalhos recentes vem demonstrando seu potencial para o tratamento de infecções bacterianas, e neste caso é denominado de inativação fotodinâmica (IFD). A IFD consiste na aplicação de um fotossensibilizador que em combinação com irradiação luminosa na presença do oxigênio molecular (O₂) promove espécies reativas de oxigênio (EROs) que induz a morte celular (PERUSSI, 2007).

Tendo em vista a resistência aos antimicrobianos convencionais, torna-se necessário o desenvolvimento de novos procedimentos para promover a inviabilização do crescimento microbiano. Neste sentido a IFD é uma alternativa promissora no combate de infecções localizadas, onde sua principal vantagem é o fato de até o momento não haver desenvolvimento de resistência ao tratamento. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de metalo-clorofila a base de íon Cu^{2+} e eosina azul de metileno segundo Giemsa, como alternativa de fotossensibilizadores na inibição da *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, a partir da IFD.

2 REVISÃO DE LITERATURA

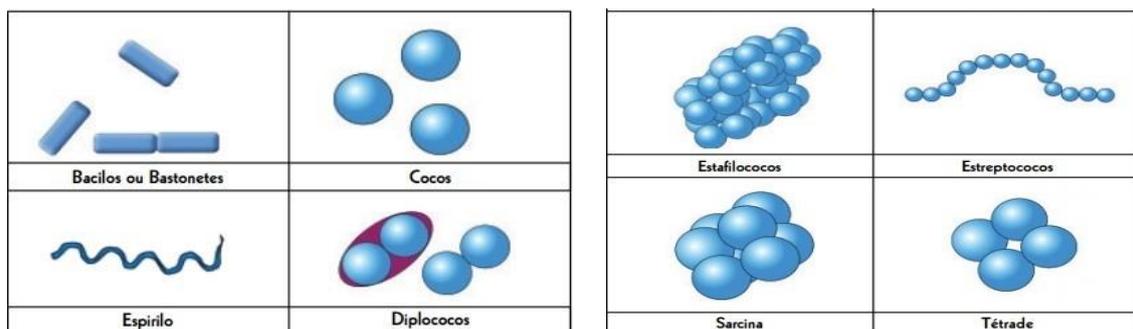
2.1 Microrganismos Bacterianos

As bactérias são seres unicelulares, procariontes, e que não apresentam núcleo diferenciado, reproduzem-se por divisão binária, e contém um grande número de espécies patogênicas para os seres humanos (WINN, *et al*, 2008). Mesmo causando uma série de doenças, as bactérias também são essenciais para a existência de plantas, animais e dos humanos, mantendo o ambiente em equilíbrio (INGRAHAM, 2010).

As células procariontes possuem poucas estruturas bem definidas, sendo sua principal característica a ausência de núcleo. Ao invés disto apresentam uma região nuclear, sendo sua parte central constituída por DNA, porem possui também RNA. Em geral as estruturas internas das bactérias contém dentro de seu citoplasma, ribossomos, um nucleóide e vacúolos (BLACK, 2013).

As bactérias normalmente apresentam de 0,5 a 1,0 μm (micrômetro) de diâmetro, e podem ser classificadas quanto a sua morfologia, sendo dos tipos: bastonetes, espirilos e cocos. Os bastonetes tem forma de bastão com a ponta arredondada, os espirilos o formato de hélice ou espiralar, e os cocos que podem ser esféricos ou elípticos. Os cocos ainda podem formar diferentes arranjos como ilustra a Figura 1 (NOGUEIRA; SOUZA 2009).

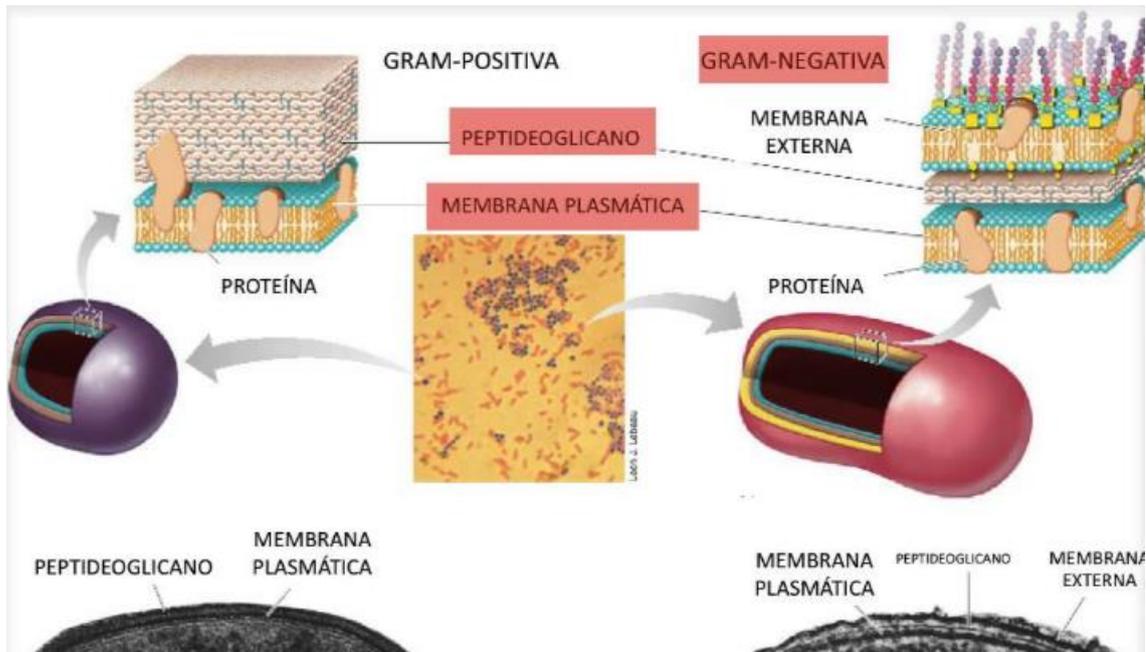
Figura 1 - Morfologia das bactérias.



Fonte: Nogueira; Souza (2009).

Outro tipo de classificação consiste na sua capacidade de reter corantes de Gram (Gram-positivas ou Gram-negativas). Esta coloração define os componentes e funções da parede celular. E assim é possível observar que a parede celular das bactérias Gram-negativas são mais complexas que as das Gram-positivas, tanto do ponto de vista químico quanto estrutural, como mostra a Figura 2 (MURRAY, 2009).

Figura 2 - Diferenças estruturais da parede das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.



Fonte: Adaptado de MADIGAN, *et al*, 2010.

A parede celular das bactérias Gram-positivas é constituída por várias camadas de peptidoglicano, e presos a essa matriz encontram-se inúmeras proteínas, polissacarídeos e ácidos teicóicos. A parede celular das bactérias Gram-negativas é mais fina, e imediatamente fora da membrana citoplasmática encontra-se o espaço periplásmico, onde há enzimas degradativas e proteínas de ligação e transporte para vitaminas aminoácidos e íons, e uma camada única de peptidoglicano forma a borda externa do espaço periplásmico (WINN, *et al*, 2008).

As bactérias Gram-positivas apresentam uma membrana externa mais espessa e porosa de peptidoglicano interconectadas, assim resíduos de ácido teicóico da parede celular contribuem para a carga negativa, e os locais de ligação consequente afinidade para as moléculas catiônicas. Por outro lado, a membrana externa das bactérias Gram-negativas é rica em lipopolissacarídeos com carga negativa, possuindo também uma forte afinidade para cátions tais como cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}) (GEORGE; HAMBLIN; KISHENA, 2009).

De maneira geral, segundo Neves *et al*. (2011) as bactérias multiplicam-se rapidamente e possuem a capacidade de mutação para que as ajudem a sobreviver na presença

de um antibiótico, tornando-as predominante na população microbiana. Apesar do avanço obtido nos últimos anos no tratamento de infecções, continua sendo preocupante o aumento da incidência do número de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos.

Neste cenário fica explícita a necessidade do desenvolvimento e validação de novos métodos de inativação do crescimento microbiano que não tenha associação com mecanismos de resistência (PERUSSI, 2007).

2.1.1 *Staphylococcus aureus*

A *S. aureus*, é a principal espécie do gênero *Staphylococcus*, são cocos Gram-positivos que tendem a ficar agrupados, como mostra a Figura 3. Essa bactéria é naturalmente encontrada na mucosa nasal e axilas (FOSTER, 1996; MURRAY, 2009). É uma das espécies mais comumente associadas às doenças humanas, e também o mais virulento. Causa intoxicação alimentar, infecções cutâneas, pneumonia, endocardites dentre outras (MURRAY, 2009).

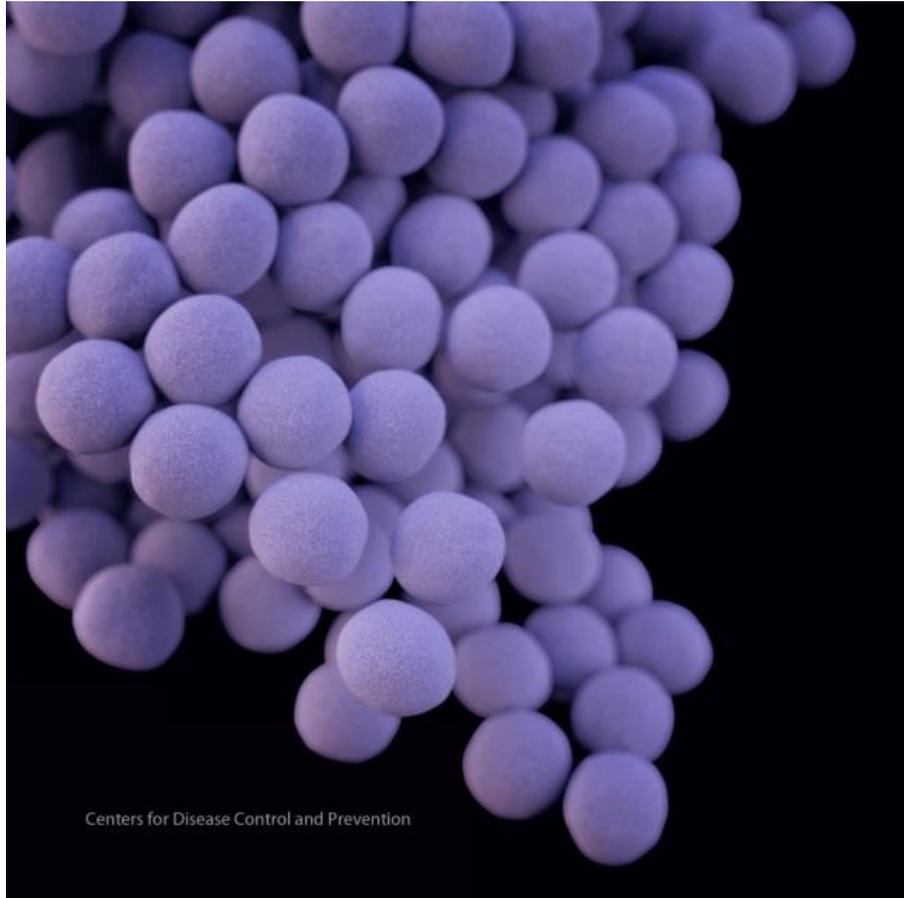
Esta bactéria desenvolveu rapidamente resistência a antibióticos β -lactâmicos pela produção de β -lactamase, e em 2003 observou-se que 50% das amostras isoladas nos EUA já apresentavam resistência à meticilina, e mostrou-se também ser causadora de infecções fora do ambiente hospitalar (ARIAS; MURRAY, 2009).

Há uma estimativa de que 25 mil pessoas morram por ano na Europa como consequência de infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos (LAXMINARAYAN, *et al.* 2013). Nos EUA um relatório realizado pelo U.S. *Centers for Disease Control and Prevention* estimou-se que ocorreram mais de 80 mil infecções por *S. aureus* MRSA (resistente a meticilina) e como consequência destas mais de 11 mil mortes em 2011 (FRIEDEN, 2013).

Em estudo realizado em 11 países latino-americanos e que inclui o Brasil mostrou a prevalência geral de MRSA (incluindo cepas adquiridas na comunidade e hospitalar) de 48,3% entre 2004-2007 (MEJIA, *et al.* 2010).

Em infecções causadas por MRSA, a vancomicina é uma opção terapêutica, entretanto, em 1996 foi reportado o primeiro caso de resistência a vancomicina (VRSA) e posteriormente a ele, surgiram outros relatos pelo mundo demonstrando que este se tornou um problema global (HIRAMATSU, 2001).

Figura 3 - Imagem da bactéria *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Center for Disease Control and Prevention.

2.1.3 *Escherichia coli*

A *E. coli* faz parte de um grande grupo denominado Enterobacteriaceae, sua morfologia é de bacilo, como apresentado na Figura 4. Essa bactéria está presente na microbiota intestinal porém, é capaz de causar infecções do trato urinário, meningite, infecções da corrente sanguínea e gastroenterites, sendo uma das bactérias Gram-negativa mais comumente encontrada em pacientes com sepse e infecções hospitalares (BROOKS, 2012; MURRAY, 2009).

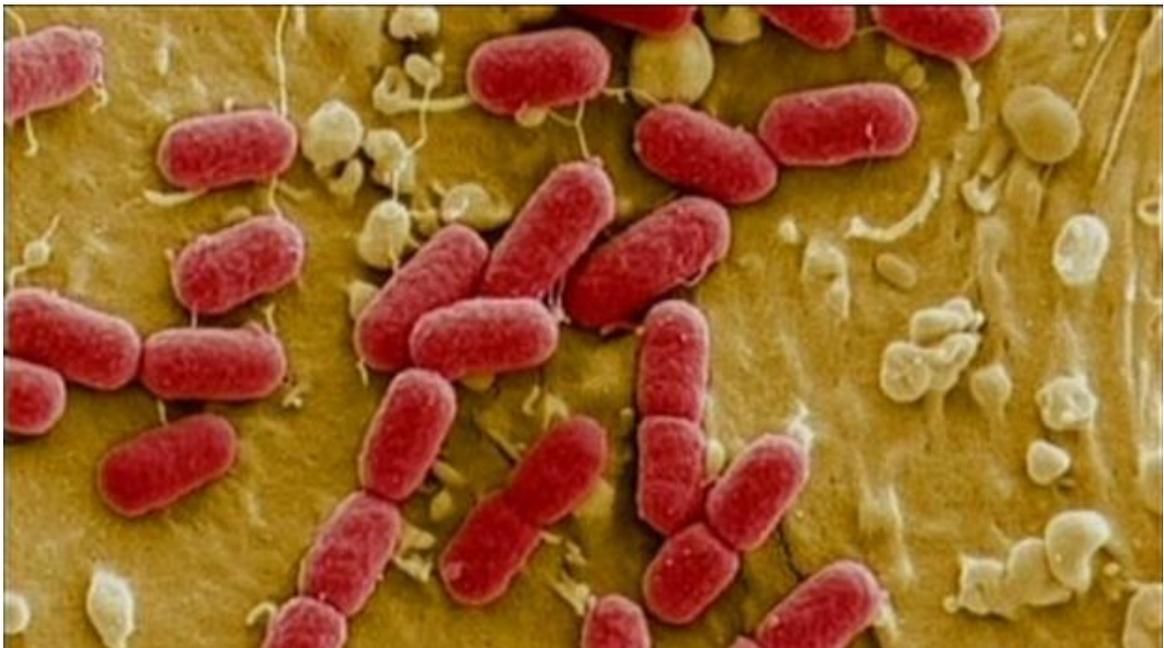
De acordo com a virulência existem pelo menos cinco grupos patogênicos que causam gastroenterite são: EPEC (*E. coli* enteropatogênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasiva), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EHEC (*E. coli* êntero-hemorrágica) e EAEC (*E. coli* enteroagregativa). A EPEC é a principal causa de diarreia aquosa infantil em países pobres (MURRAY, 2009).

Segundo Shariff *et al.* (2013) em unidades de terapia intensivas (UTI) as infecções de trato urinário por *E. coli* são as mais comuns extra intestinais, e sua múltipla resistência a medicamentos cresceu dramaticamente nos últimos anos.

Recentemente foi relatado na China uma *E. coli* resistente a colistina, antimicrobiano de largo espectro, que pertence à família das polimixinas. Esta descoberta decorreu da investigação, em suínos, alimentos e humanos. A resistência à colistina é mediada por plasmídeo, caracterizado por uma alteração genética designada *mcr-1*. Este mecanismo de ação gera uma emergência em resistência em Enterobacteriaceae. Os isolados destas bactérias tanto em animais quanto em humanos, tornou-se uma preocupação global, tendo em vista a capacidade dos plasmídeos *mcr-1*-positivos de transferir esta resistência à *E. coli* patogênicas humanas (LIU, *et al.*, 2016).

Em estudo multicêntrico realizado no Brasil por Fernandes, *et al.*, (2016) de 2000 a 2016 evidencia o aparecimento de *mcr-1*-positivas na América Latina desde 2012 em isolados de alimentos, humanos e animais. Em 2016 também foi reportado o aparecimento de *E. coli* *mcr-2*, resistente a colistina. O surgimento destas cepas representa uma mudança de paradigma nos mecanismos de resistência a colistina, que antes se restringiam a transmissão vertical, para os descendentes (Xavier, 2016).

Figura 4 - Imagem da bactéria *Escherichia coli*.



Fonte: COTTER, 2014.

2.1.4 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* apresenta mais de 140 espécies, dentre elas a *P. aeruginosa*, normalmente habita solo, água e vegetação, e pode ser encontrado também na pele, e menos comumente na orofaringe e fezes de pessoas saudáveis (IGLEWSKI, 1996).

Espécies como a *P. aeruginosa* são bastonetes Gram-negativos como mostra Figura 5 e podem sobreviver em condições adversas, pois tolera uma vasta gama de temperaturas (4 a 42 °C) e possui mínimas exigências nutricionais (MURRAY, 2009).

Um dos mecanismos de proteção da *P. aeruginosa* é um sistema denominado de bomba de efluxo, ele é um sistema de transporte ativo para o exterior da célula, responsável por exportar substâncias tóxicas e metabólitos secundários (NEVES, 2011).

Essa bactéria tem caráter oportunista e é considerada de difícil tratamento. É responsável por infecções sérias em pacientes imunocomprometidos, e um dos principais agentes de infecção nosocomial em hospitais brasileiros. A importância clínica da *P. aeruginosa* decorre de sua capacidade de sobreviver em diferentes condições e sua múltipla resistência a agentes antibacterianos, levando a uma difícil erradicação da doença e possibilitando que uma colonização localizada que pode rapidamente induzir uma infecção generalizada elevando os índices de morbidade e mortalidade (HASHIMOTO *et al.*, 2009; NEVES *et al.*, 2011).

Resultados de estudos epidemiológicos obtidos pelo SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*) em e MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*) ano 2003 demonstraram que a *P. aeruginosa* é o terceiro patógeno mais frequente com resistência ao medicamento imipenem (IPM) em pacientes hospitalizados, sendo relatados no Sul e Centro-Oeste do Brasil percentuais de resistência podem chegar de 58,9% até 82,7% respectivamente (NEVES; *et al.*, 2011). O IPM é um antibiótico carbapenêmico de amplo espectro, derivado da tienamicina, com atividade bactericida utilizado como último recurso no tratamento de infecções hospitalares infecções por *P. aeruginosa* multirresistentes (NEVES; *et al.*, 2011; PIRES; *et al.*, 2009).

Figura 5 – Imagem da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*



Fonte: BBC NEWS. Disponível em: < <http://www.bbc.com/news/uk-northern-ireland-17047276>>

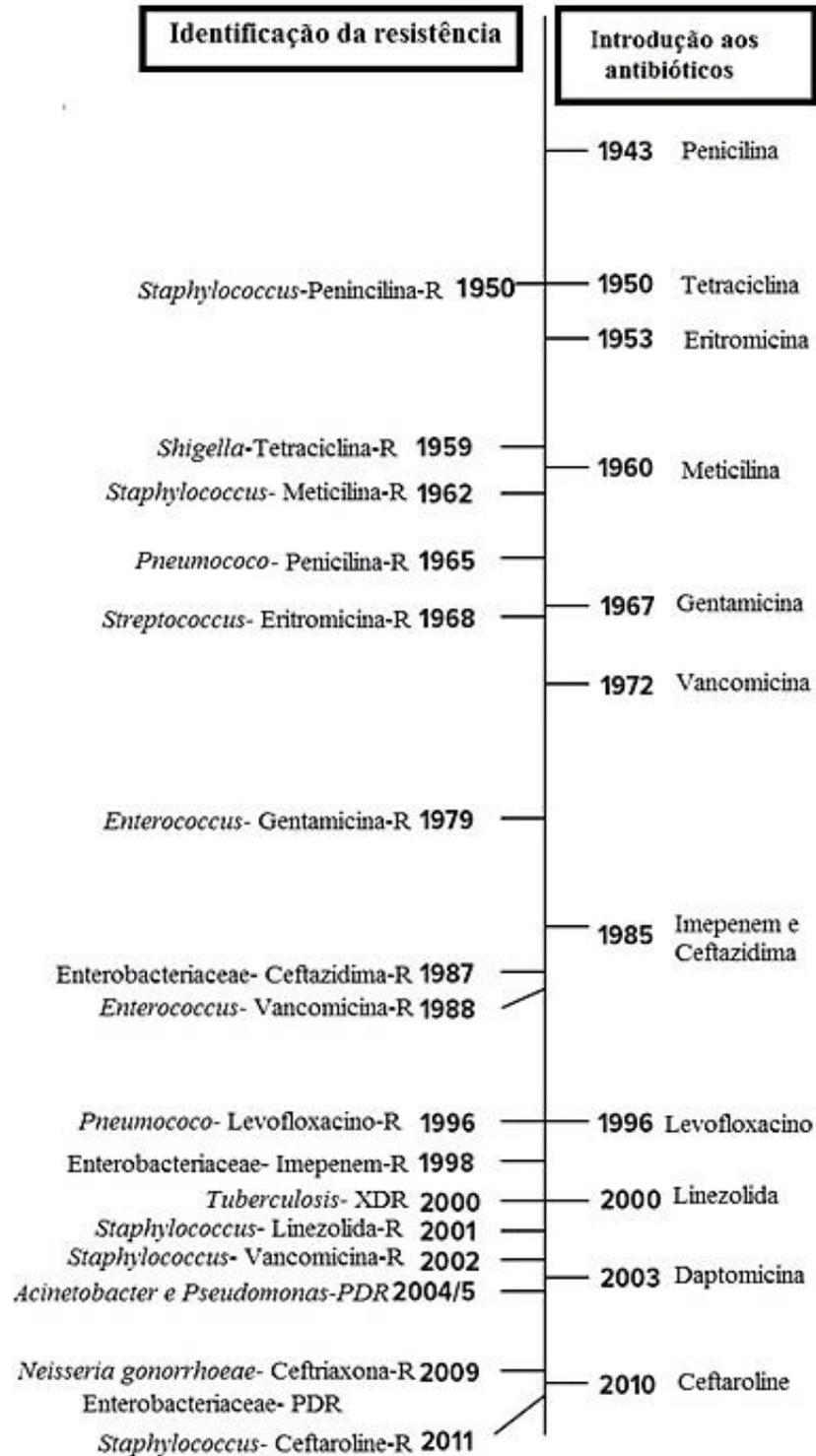
2.1.5 Resistência bacteriana aos antibióticos

Um grande número de bactérias resistentes a antibióticos tem surgido em decorrência de sua utilização indiscriminada e falta de investimento em desenvolvimento de novos fármacos, comprometendo o seu uso (ALANIS, 2005; VENTOLA, 2015).

A era moderna dos antibióticos começou com a descoberta da penicilina por Sir Alexander Fleming, sendo utilizada na década de 1940 em infecções sérias em soldados na II Guerra Mundial (ALANIS, 2005; VENTOLA, 2015). Segundo Alanis, 2005 o uso de antibióticos virou uma panaceia, pois era utilizado para tratar infecções triviais e até mesmo de origem não bacteriana. Assim, a emergência de resistência a penicilina em 1950 criou um problema clínico substancial.

Em resposta a esta resistência, os beta-lactâmicos foram desenvolvidos, porém o primeiro caso de meticilina resistente em *S. aureus* (MRSA) foi identificado na mesma década, no Reino Unido em 1962. E assim como podemos observar na Figura 6 a resistência aparece a quase todos os antibióticos (VENTOLA, 2015).

Figura 6 – Linha do tempo demonstrando a inserção dos antibióticos e o aparecimento de resistência.

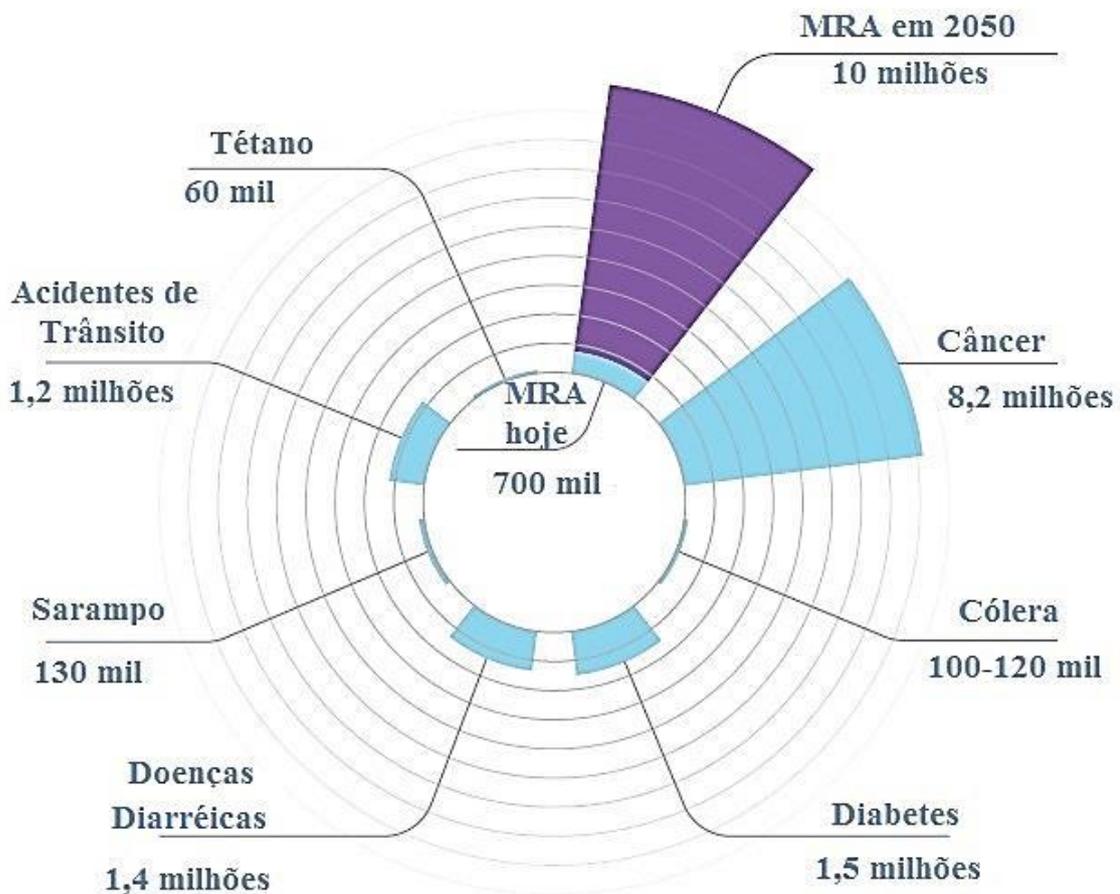


Onde: R= resistente, PDR= -Pan-droga resistente , XDR= extensa resistência a drogas.

Fonte: Adaptado de Frieden, (2013).

Segundo O'Neill (2016) em 2050 estima-se que caso nenhuma medida seja tomada serão mais de 10 milhões de mortes por ano em decorrência de microrganismos resistentes a antibióticos, (Figura 7). Essa projeção demonstra que microrganismos resistentes a antibióticos poderá matar mais do que o câncer e outras doenças, a um custo cumulativo para a produção econômica 100 trilhões de dólares.

Figura 7 – Projeção do avanço dos microrganismos resistentes a antibióticos.



Fonte: Adaptado de O'Neill (2016).

2.2 Terapia fotodinâmica (TFD)

O princípio da fototerapia dinâmica foi descrito por Oscar Raab em 1900, quando foi observado o efeito tóxico da acridina laranja combinada à luz e oxigênio, destruindo o protozoário *Paramecium caudatum*, (KIM, *et al.*, 2015; RAAB, 1900). Posteriormente em 1903, H. Von Tappeiner e A. Jesionek tratou de tumores de pele, com eosina topicamente

aplicada, luz branca, e descreveu o fenômeno como ação fotodinâmica, hoje conhecida como fototerapia dinâmica (DOLMANS, 2003).

A TFD é uma modalidade de tratamento que atua a partir de uma reação fotoquímica com o objetivo de causar destruição seletiva de um tecido. A aplicação da técnica consiste em duas etapas, utilização de uma droga sensibilizante, tópica ou sistêmica, seguida da irradiação de luz. Nesse processo, os fotossensibilizantes são ativados pela luz e transferem energia ao oxigênio molecular, gerando EROs para induzir a morte celular (ISSA; MANELAZULAY, 2010).

A TFD tem inúmeras vantagens, como a de dupla seletividade, pois não apenas o FS pode ser direcionado para as células ou tecido doente, como a luz também pode ser focalizada no local da lesão. O procedimento pode ser repetido várias vezes por não apresentar efeito tóxico cumulativo. No caso do uso de fotossensibilizadores sistêmicos a exposição à luz deve ser evitada até por algumas semanas, pois poderá apresentar um efeito colateral que é a sensibilização a luz (PERUSSI, 2007).

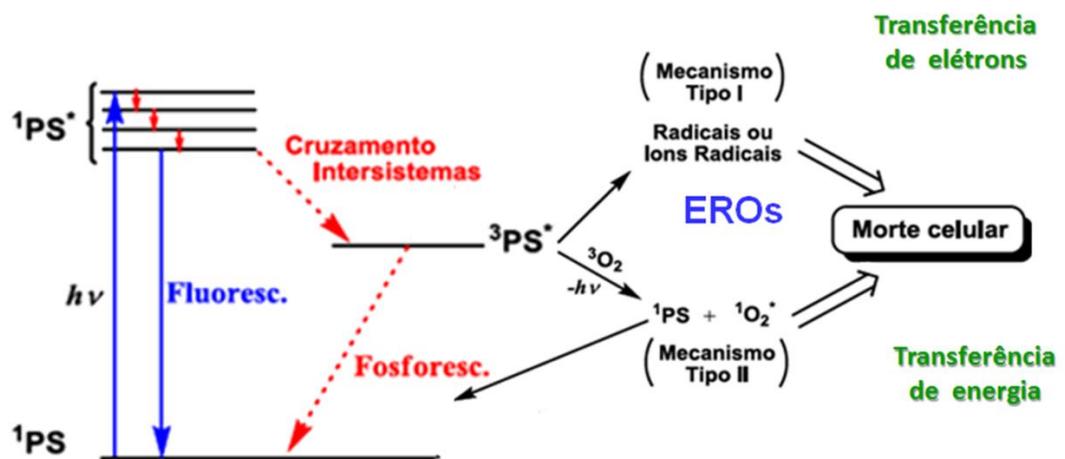
Na TFD o fotossensibilizador (FS) injetável é colocado na corrente sanguínea e absorvido por diversas células, apesar de não ser bem entendido, ele permanece nas células tumorais por um tempo maior. Assim a TFD pode ser realizada quando o FS for eliminado pelas células normais, matando de forma seletiva apenas as células tumorais (PERUSSI, 2007).

E embora a TFD tenha sido originalmente desenvolvida visando à terapia de câncer, trabalhos vêm demonstrando o seu grande potencial para outras moléstias, como por exemplo, a destruição de infestações bacterianas resistentes a tratamentos tradicionais a base de antibióticos. Nessa modalidade de tratamento a terminologia mais utilizada é Inativação Fotodinâmica (IFD) (DEMINOVA; HAMBLIN, 2005; MACHADO, 2000).

A IFD de microrganismos, assim como a TFD aplicada ao tratamento de câncer, é uma terapia que envolve a combinação sinérgica de um fotossensibilizador, oxigênio molecular (O_2) e irradiação luminosa. O papel do fotossensibilizador é absorver a luz e servir como um intermediário para transferir a energia para o oxigênio. Durante esse processo, o oxigênio molecular presente na célula no estado triplete (3O_2), estado fundamental e estável da molécula, passa para o estado singlete (1O_2). Ao contrário do estado 3O_2 , o estado 1O_2 é extremamente reativo e induz a morte da célula hospedeira a partir da oxidação de seus constituintes (RIBEIRO, *et al.*, 2005).

Durante IFD pode-se diferenciar dois mecanismos de geração de EROs, denominada tipo I e/ou II. O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é gerado no mecanismo tipo I através da transferência de elétrons do fotossensibilizador, excitado pela luz, para o oxigênio no estado fundamental. Os processos moleculares que ocorrem no estado excitado são demonstrados pelo diagrama de Jablonski na Figura 8. A reação do tipo II ocorre quando há transferência de energia, o oxigênio molecular passa para o estado excitado singleto (HAMBLIN, 2016; RIBEIRO, 2008).

Figura 8 - Diagrama de Jablonski Simplificado.



Onde 1PS demonstra a molécula no estado fundamental, $^1PS^*$ e o estado excitado e o decaimento ao estado fundamental que pode ser por fluorescência ou cruzamento intersistema, passando para o estado tripleto $^3PS^*$ que por sua vez emite fosforescência.

Fonte: Oliveira, 2014.

A física define a luz como uma onda eletromagnética, assim a frequência de oscilação determina a cor da luz. Após absorver a luz na região do visível o fotossensibilizador é excitado, podendo retornar ao estado fundamental 1PS emitindo energia (fluorescência), sofrer uma inversão de spin (cruzamento de intersistema) ou indo ao estado tripleto, e retornando ao estado fundamental pelo processo de fosforescência (OLIVEIRA, 2015).

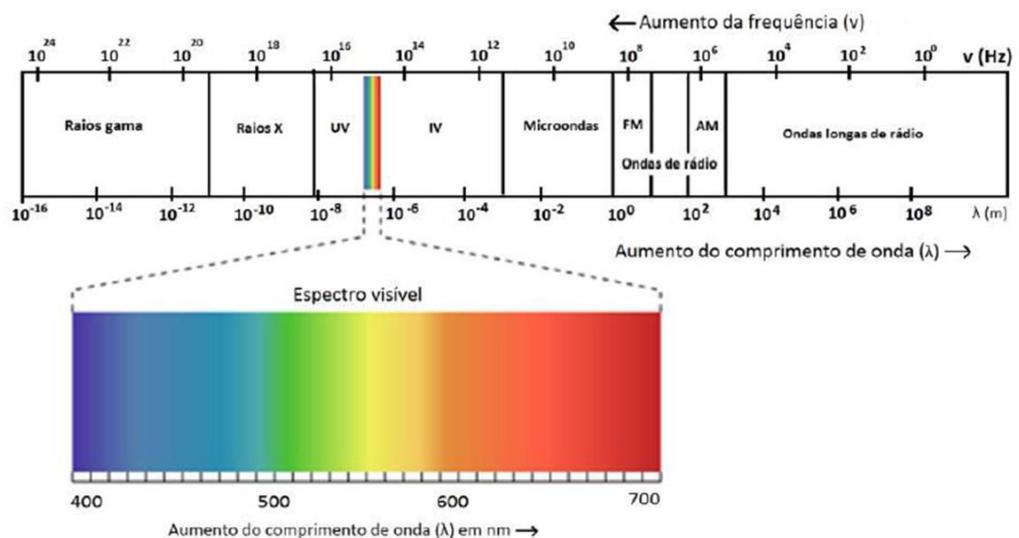
É importante destacar que o cruzamento intersistemas é favorecido pela presença de átomos pesados na estrutura da molécula, pois os mesmos aumentam a probabilidade da passagem da molécula do estado excitado singlete para o tripleto. Como apresentado no diagrama de Jablonski, a ação fotodinâmica só poderá acontecer após a molécula estar no estado tripleto excitado (WAINWRIGHT, 2016).

A IFD pode ser feita por aplicação local do fotossensibilizador na área infectada por aplicação tópica, instilação, injeção intersticial ou aerossol, de forma que pode ser usada como uma terapia alternativa para infecções localizadas. A extensão da morte celular microbiana será dependente da concentração (dose) do fotossensibilizador, bem como do comprimento de onda da luz, do tempo e da intensidade de irradiação. Uma das vantagens da IFD de microrganismos é que o efeito bactericida é rápido, altamente localizado, não interferindo com a microbiota de outros sítios corpóreos. Além disso, como o evento citotóxico é dependente da produção de oxigênio singlete e radicais livres, o desenvolvimento de resistência ao procedimento é pouco provável (GEROLA, 2010; HAMBLIN; HASAN, 2004).

O fotossensibilizador é ativado de acordo com o espectro de absorção do composto, e a penetração da luz nos tecidos aproxima-se do comprimento de onda 630nm, com um alcance de 5 mm na maioria dos tecidos (KALKA, *et al*, 2000).

Diversas fontes de luz podem ser utilizadas, a absorção máxima das porfirinas acontece com 405 nm , porém neste comprimento de onda a luz é capaz de atravessar a pele apenas de 1 a 2 mm e possui outros picos de absorção, uma delas no comprimento de onda 630 nm que obtém uma maior penetração. A figura 9 mostra o espectro eletromagnético (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

Figura 9 - Espectro da radiação eletromagnética.



Fonte: Oliveira, 2015.

2.2.1 Laser versus LED

A luz laser, originada a partir da amplificação da luz por emissão estimulada de radiação, e em especialmente o laser de baixa intensidade, vem sendo utilizado para promover efeitos biológicos como analgésico, anti-inflamatório e no reparo de feridas, entretanto são contraindicações relativas feridas infeccionadas (LINS, *et al.* 2010, ROBERTSON, 2009).

A luz do laser é sempre concentrada em uma mesma área e não diminui sua intensidade com a distância, possuindo como características a monocromaticidade e a coerência, o que significa que os comprimentos de onda possuem a mesma frequência e se propagam na mesma direção. Dessa forma o feixe de luz permanece paralelo e colimado (ROBERTSON, 2009).

Todavia o equipamento laser é demasiadamente caro quando comparado a outras alternativas de luz como o LED (Light Emitting Diode). Do ponto de vista da luz emitida pode ser dizer que são similares, já que possuem uma banda espectral estreita, entretanto a luz LED não é colimada ou coerente, mas sua grande vantagem é seu baixo custo (CORAZZA, 2005).

Em seu estudo Corazza (2005) comparando os efeitos angiogênicos da luz laser e LED, demonstra que a colimação e coerência não são características essenciais para a fototerapia e sim o comprimento de onda da luz absorvido. Consequentemente, a fonte de luz LED se mostra uma ferramenta atrativa para o uso na fototerapia.

2.2.2 Resistência a IFD

Apesar de vários autores afirmarem que a resistência a IFD seja improvável, em decorrência do mecanismo de morte não específico (EROS causa danos em diversas estruturas bacterianas) o assunto é controverso (TAVARES, *et al.*2010)

Estudos tem tentado induzir a resistência à IFD, matando repetidamente e renovando amostras bacterianas, Bartolomeu, *et al.*, (2016) demonstraram em seu estudo que após submeter *S. aureus* ATCC e MRSA a IFD, as cepas sobreviventes do 1 ciclo eram submetidas ao IFD por mais 9 ciclos, promovendo a inativação de ambas as cepas mesmo após 10 ciclos de IFD, sem que houvesse fotoresistência .

Segundo Tavares e colaboradores (2010), corroborando com a literatura, após irradiação das cepas por 10 ciclos foi observado à ausência de mecanismos de resistência ao processo fotodinâmico, matando 99, 99% das bactérias testadas. Em estudo feito por Giuliani, *et al.* (2010) também demonstrou a ausência de resistência a IFD mesmo após 20 ciclos de fotoinativação.

Por fim, é importante ressaltar que a pré-existência de resistência das bactérias a antibióticos não prejudica o processo fotodinâmico, de forma que a IFD funciona tão bem nas bactérias resistentes quanto nas bactérias susceptíveis a antibióticos (GIULIANI, *et al.* 2010).

2.3 Fotossensibilizadores

2.3.1 Historia dos fotossensibilizadores

A primeira descrição da ação fotoantimicrobiana foi em 1900 por Oscar Raab utilizando os corantes acridina e eosina (RAAB, 1900; WAINWRIGHT, *et al.*, 2016). Segundo Issa e Manela-Azulay (2010) o trabalho não alcançou a repercussão merecida.

A FTD envolve a administração de um fotossensibilizador não tóxico, sendo as porfirinas as mais exploradas, entretanto, em 1960 iniciou-se estudos com as hematoporfirinas (DOLMANS, 2003).

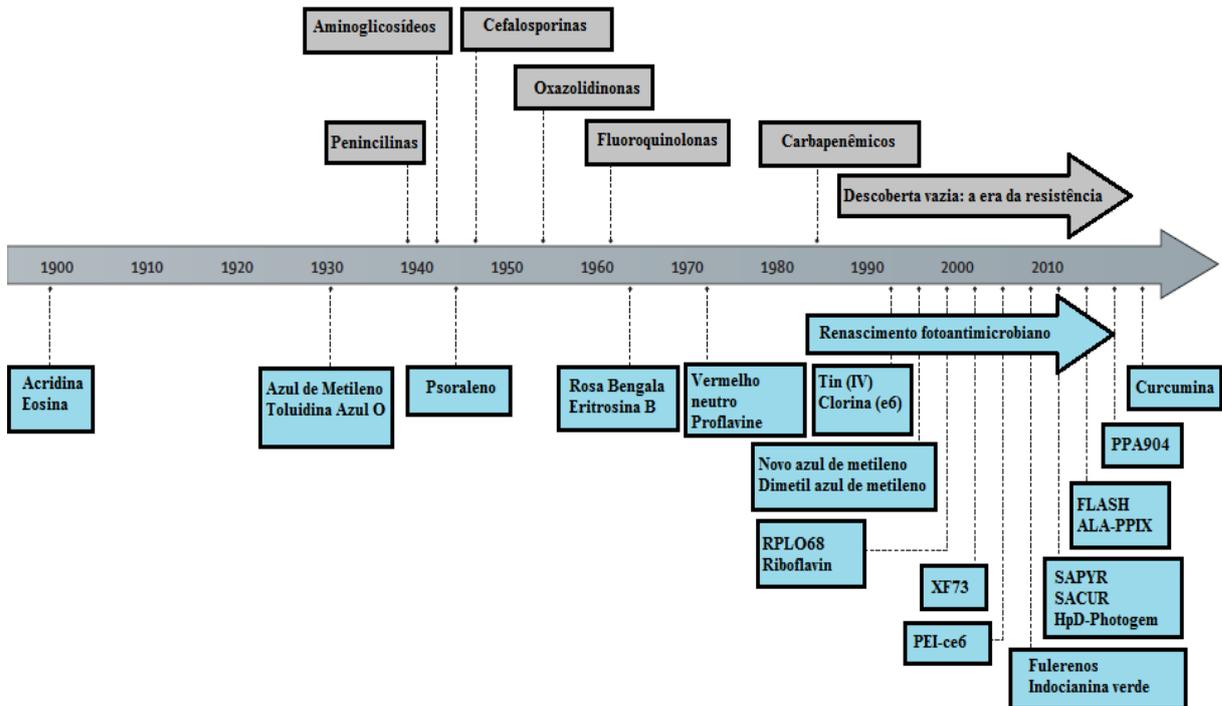
A chamada primeira geração de fotossensibilizadores eram basicamente injetados por via intravenosa, pois os mesmos não tinham uma boa penetração pela pele (CALZAVARA-PINTON, P.G.; VENTURINI, M., 2006).

Em 1990 Kened e colaboradores desenvolveram o fotossensibilizador tópico, denominado 5-ácido aminolevulínico (ALA) que superou muitas das limitações existentes do PDT, considerado de segunda geração (KIM, 2015). É importante ressaltar que na dermatologia, a TFD não cresceu até 1990, como mostra a Figura 10. Todavia seu uso na TFD com ALA tópico tem aprovação pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para tratamento de Queratose actínica (QA) que é uma lesão pré-cancerígena e alguns tipos de câncer desde 1999 (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

A maioria dos compostos utilizados para o PDT absorvem na região do vermelho podendo ser ou não porfirinas, um exemplo de porfirina seriam as clorinas, e de não porfirinas

podemos citar as fenotiazinas (Azul de metileno e Azul de toluidina), xantenos (Rosa bengala e Eosina Y) e curcuminóides (curcumina) (ORMOND; FREEMAN, 2013).

Figura 10 - Linha do tempo da descoberta de antibióticos e fotoantimicrobianos.



Onde : RLP068 = Tetracatiônico Zn (II) cloreto de ftalocianina. XF73 = porfirina carregada positivamente. PEI-ce6 = polietilenoimina clorina (e6) conjugado. SAPYR = derivado de perinaptenona. SACUR = derivado de curcumina. HpD-Photogem = derivado de haematoporfirina. FLASH = derivado de riboflavina catiônico. ALA-PPIX = protoporfirina IX induzida pelo ácido 5-aminolevulínico. PPA904 = derivado tetrabutílico de azul de metileno.

Fonte: Adaptado de Wainwright, *et al.*, (2016).

Com relação à internalização do fotossensibilizador pelo microrganismo, sabemos que o processo funciona de maneira parecida com a coloração de Gram, sendo assim as espécies Gram-positivas capturam mais facilmente o corante e são também facilmente mortas diferentemente das Gram-negativas (PERUSSI, 2007).

Para que ocorra a inativação bacteriana é necessário que o FS penetre a parede celular, o que é limitado na Gram-negativa devido à membrana celular, visando melhorar esta penetração agentes desorganizadores de membrana são utilizados (SPERANDIO, 2013).

Segundo Hamblin (2016) o fotossensibilizador deve ter moléculas catiônicas, pois as células microbianas apresentam maior carga negativa se comparados a células de mamíferos, sendo assim a molécula catiônica é absorvida mais rapidamente pelas células microbianas que pelas células de mamíferos, obtendo boa seletividade e podendo rapidamente ser aplicado.

São características importantes para um bom fotossensibilizador baixa toxicidade no escuro, alto rendimento quântico para a produção de oxigênio singlete, intensa absorção de luz na região do vermelho (600-800 nm) e efeito acumulativo em célula tumoral (no caso do PDT) (ORMOND; FREEMAN, 2013).

Com relação à eficiência do fotossensibilizador ela é aumentada quando na sua composição encontram-se átomos pesados, porque os mesmos induzem uma maior estabilidade do estado tripleto excitado (WAINWRIGHT, 2016).

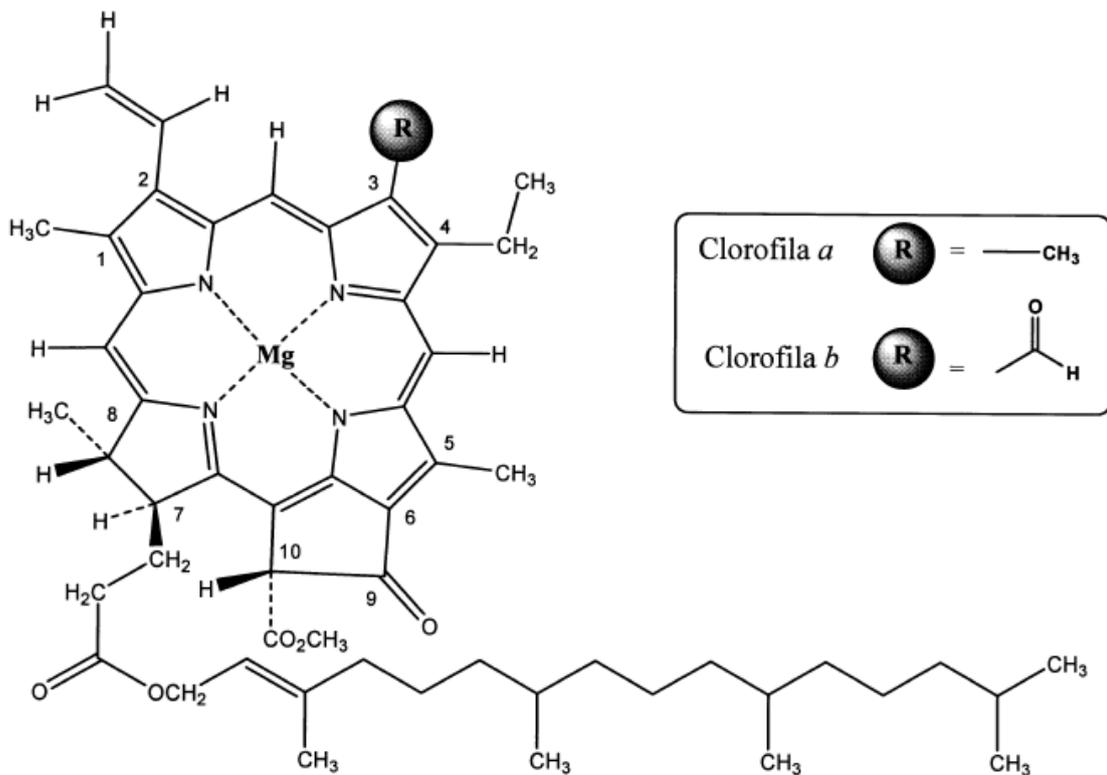
2.3.2 Clorofilina cúprica de sódio

A clorofila é um pigmento natural produzido principalmente nas folhas das plantas e podem ser divididas entre clorofila a e clorofila b, como mostrado na Figura 11, e sua estrutura química possui um Mg^{2+} no centro, que pode ser retirado por ação de ácidos se transformando em feofitina e substituídos por outros metais. Complexos de cobre tem o metal fortemente ligado ao centro da molécula, onde nem mesmo o ácido clorídrico concentrado pode liberá-lo, isto faz com ele se torne seguro para coloração de alimentos, pois o cobre (Cu^{2+}) não é absorvido pelo organismo (HUMPHREY, 1980).

A clorofila é uma molécula abundante na natureza e sua estrutura química pertence à classe das porfirinas, tendo como átomo central o Mg^{2+} (magnésio) segundo Streit, *et al.* (2005), possuindo alta absorção de luz na região entre os comprimentos de onda 650 e 670 nm (vermelho) e longo tempo de vida do estado excitado.

As características da clorofila a tornam um bom candidato para ser utilizado como fotossensibilizador por apresentar a possibilidade de se obter alto rendimento quântico de oxigênio singlete (GURGEL, 2013). Todavia, a baixa estabilidade da molécula de clorofila faz com a mesma tenha uma baixa eficácia como agente fotossensibilizante. Esse problema de instabilidade pode ser superado ao modificar quimicamente a molécula de clorofila ao substituir o Mg^{2+} por outros íons metálicos (por exemplo: Zn^{2+} , Fe^{2+} e Cu^{2+}), pois essas metalo-clorofilas são mais estáveis e podem ser utilizadas em formulações hidro e lipossolúveis (STREIT *et al.*, 2005).

Figura 11 - Estrutura química da clorofila a e b.

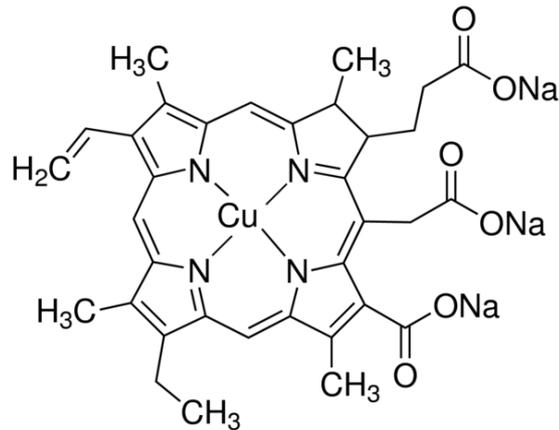


Fonte: Streit, (2005).

A clorofilina cúprica é um pigmento obtido a partir da clorofila pela hidrólise do fitil e metil esters, clivagem do anel ciclopentanona e substituição do Mg^{2+} por Cu^{2+} . As metaloclorofilinas diferentemente da clorofila, são hidrossolúveis e apresentam maior estabilidade frente a ácidos e agentes oxidantes (VOLP, 2009).

A clorofilina cúprica de sódio (CuChlNa) é comercialmente disponível, e espectroscopicamente é muito parecida com a clorofila CuChlNa, sua estrutura química esta representada na Figura 12. Isto significa uma intensa banda de absorção no comprimento de onda 630 nm, o que é ideal para terapia fotodinâmica (UCHOA, *et al*, 2015).

Figura 12 - Estrutura química da Clorofilina cúprica de sódio.



Fonte: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

2.3.3 Eosina azul de metileno tipo Giemsa

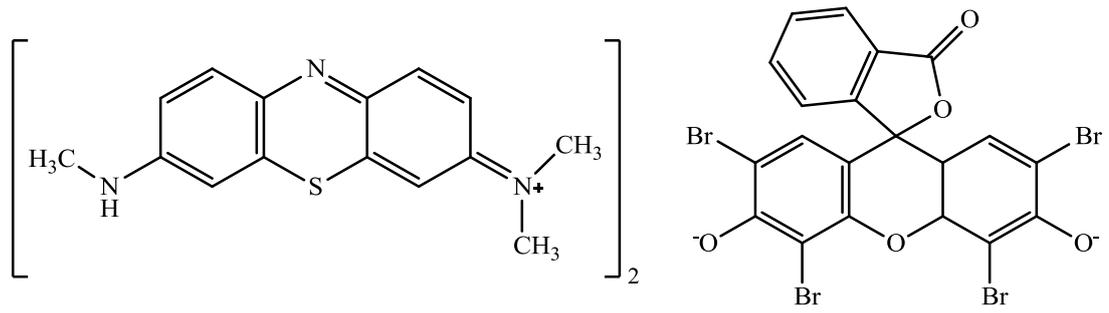
Em 1891 Dimitri Romanowsky desenvolveu um método de coloração para a diferenciação entre núcleo e citoplasma, e a partir desta versão todos os compostos análogos seriam denominados corantes Romanowsky sendo compostos que contêm azul de metileno oxidado e eosina (Woronzoff-Dashkoff, 2002).

Gustav Giemsa trabalhou em um produto da oxidação do azul de metileno denominado Azure I e que é considerado um corante puro, e publicou em 1904 o corante que levou seu nome (BARCIA, 2007).

O corante Wright-Giemsa tem um passado histórico longo, de receitas clandestinas e de mistério que o rodeia ainda hoje, como pequenas variações na composição do corante ou sutis diferenças na técnica de coloração pode produzir mudanças dramáticas (Woronzoff-Dashkoff, 2002).

Dentre os vários corantes utilizados na inativação fotodinâmica o eosina azul de metileno tipo Giemsa ainda, não foi explorado até onde sabemos. Ele é um composto policromático, composto dos corantes azur II (mistura não oxidada de azur I e azul de metileno) e eosinato de azur II (formado pela combinação equimolar de azur I, azul de metileno e eosina amarelada-Y) como demonstra a Figura 5, dentre suas aplicações é comumente utilizado na citogenética vegetal (BRAMMER, 2015).

Figura 13 - Estrutura química do corante Giemsa.



Fonte: autor.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana de metalo-clorofila a base dos íons Cu (II) e do corante eosina azul de metileno frente a inibição de crescimento das bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* por meio da Inativação Fotodinâmica.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a janela fotodinâmica dos fotossensibilizadores EAM e CuChlNa através de espectroscopia de Abs/UV-vis;
- Determinar a citotoxicidade dos fotossensibilizadores para células de mamíferos;
- Avaliar a inativação fotodinâmica de cepas de microrganismos *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, quando submetida ao processo de terapia fotodinâmica utilizando a metalo-clorofila, e eosina azul de metileno como agentes fotossensibilizantes.
- Avaliar a inativação das cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, utilizando metalo-clorofila, e eosina azul de metileno na ausência da luz.

4 METODOLOGIA

4.1 Corantes

Os corantes utilizados no presente estudo foram Clorofilina de sódio-cúprico grau comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e Eosina Azul de Metileno Segundo Giemsa (Vetec Química- Rio de Janeiro, RJ).

4.1.1 Preparação dos corantes

Os corantes foram pesados em balança analítica e colocados em recipientes estéreis, e ao corante adicionado água destilada para que se obtivesse uma solução estoque.

4.2 Medidas de absorção óptica

Para determinação da janela fotodinâmica, foi realizada a determinação da região de máxima de absorção de cada fotossensibilizador através de um espectrofotômetro modelo USB 4000 da Ocean Optics . As análises de caracterização de absorção no UV-VIS foram realizadas no laboratório de Óptica e Fotônica localizado no Instituto de Física da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). As medidas de absorção foram realizadas de 200 nm a 800 nm, usando cubeta quartzo de quatro faces polidas de 10 mm de caminho óptico.

Para realizar as medidas de absorção UV-Vis, Os corantes CuChlNa e EAM foram solubilizados em meio aquoso (separadamente), nas concentrações, 100 μM , 50 μM , 40 μM , 20 μM , 10 μM e 5 μM respectivamente.

4.3 Citotoxicidade dos Fotossensibilizadores

Foi realizado atividade citotóxica em célula NIH/3T3 (ATCC-CRL 1658, fibroblastos de rato) células do banco do Rio de Janeiro, manutenção e tratamento celular foram realizadas como descrito por Freshney (FRESHNEY, 2005).

4.3.1 Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado em parceria pelo Grupo de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFMS sendo realizado utilizando sulfo-rodamina B (SRB) como descrito por Skehan *et al.*, (1990) . As células criopreservadas em nitrogênio líquido foram descongeladas e cultivadas em frascos estéreis contendo o meio de Dulbecco modificado essencial mínimo (DMEM) suplementado com soro fetal bovino a 10% e gentamicina a 50 µg/mL (Europharma) (meio completo). Os frascos foram então colocados a 37°C numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂ (SKEHAN, *et al.*, 1990).

As células aderentes foram removidas com tripsina (1 mM + 0,25% de EDTA) em PBS com pH 7,4 e transferidos para tubos cônicos contendo meio de cultura completo. Após a centrifugação de baixa velocidade, o meio contendo tripsina foi descartado e as células ressuspensas num pequeno volume de meio completo. As células viáveis foram contadas utilizando “tripan blue” numa câmara de Neubauer.

A suspensão de células foi preparada e 100 µL de meio contendo 7500 células foi depositada em cada poço de uma placa de 96 poços. As placas foram estabilizadas por incubação a 37 ° C numa incubadora de CO₂ durante 24 h. Subsequentemente, uma alíquota de cada fracção das amostras de teste previamente dissolvidos em meio foram adicionados aos poços, resultando em quatro concentrações, para cada amostra de ensaio (0,25, 2,5, 25, e 250 g/mL), em triplicata.

Como controle negativo, as células foram cultivadas na ausência de qualquer amostra de teste. Todas as placas permaneceram expostas, às amostras de teste na incubadora, durante 48 h e foram subsequentemente fixadas com ácido tricloroacético a 20% a 4 °C durante 30 min. O sobrenadante foi descartado e a placa foi lavada com água, seca-se por adição de 50 uL de 0,1% de SRB em ácido acético diluído, e incubou-se à temperatura ambiente durante 30 min. O excesso de corante foi removido com ácido acético a 1%, seguido de secagem das placas e adição de base Tris 10 mM para solubilizar o corante ligado à membrana proteínas das células fixadas. As placas foram agitadas durante 10 minutos para dissolver as proteínas marcadas e lidas num leitor de microplacas óptica a 540 nm.

4.3.2 Interpretação das análises de citotoxicidade

A análise estatística também levou em conta repetições e tratamentos. Para o ensaio *in vitro*, a análise estatística levou em consideração os valores da absorbância obtidos para as amostras de teste (T), o controle negativo (CN), as amostras de ensaio em branco (B), e o início da incubação, isto é, antes da adição de amostras de teste (T₀). Com base nestes dados, a resposta celular da incubação com as amostras de teste pode ser categorizada como a inibição ou ausência de efeito no crescimento celular. $T \geq T_0$ e $T < CN$ indicam que o crescimento foi inibido (efeito citostático). Para estas condições, o crescimento celular (%) é calculado como $100 \times [(T - T_0) / (CN - T_0)]$. Para $T < T_0$, a amostra celular induzida morte, um efeito citotóxico, calculada como $100 \times [(T - T_0) / T_0]$ (SHOEMAKER, 2006; MONKS, *et al.*, 1991). As taxas de crescimento celular (%) calculadas a partir destas fórmulas, em seguida, foram submetidas à regressão não-linear usando software Origin 6.0 (OriginLab) para o cálculo de IC₅₀ (concentração de droga que inibiu o crescimento celular em 50%), que expressa a atividade citotóxica.

4.4 Bactérias

Os experimentos foram realizados com cepas padrões: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). As cepas foram mantidas em Caldo Muller Hinton (CMH) acrescidas de glicerol a 20% e mantidas em freezer.

4.5 Ensaio Biológicos

As suspensões bacterianas foram preparadas a partir de estoque em ependorfe mantido no freezer, com a cepa e glicerol a 20%. Para tanto foi adicionado, 10 µL do estoque que foi inoculado em 2 ml CMH, a solução foi mantida em estufa a 37 °C, durante 18 h para obter o crescimento. Após esse período o inóculo foi diluído em salina até a obtenção de turvação de 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), acrescentando gradativamente o inóculo a 2 ml de salina, o excesso foi retirado para que se mante-se no final 2 ml solução (salina, inóculo e corante).

4.6 Determinação da Inibição do Crescimento Bacteriano

Para a determinação da inibição bacteriana, os inóculos foram divididos em dois grupos: um que foi protegido da luz em temperatura ambiente envolto em papel alumínio (Controle), e outro grupo que recebeu irradiação por 1 hora. Ambos os grupos tinham a concentração zero, onde não era colocado o fotossensibilizador, para observar se havia influencia da luz na ausência do corante.

Na solução de 2 ml de salina mais inoculo foram adicionadas as proporções de corante EAM tipo Giemsa ($C_{14}H_{14}ClN_3S$) e Clorofilina de sódio-cúprico necessárias para que se chegasse as concentrações de 1,0; 2,5; 5 ; 10 ; e 20 μM para *S. aureus*, e já para *Escherichia coli* 5 , 10, 20, 40 e 50 μM .

Para os testes a bactéria *S. aureus* foi preparada em tubos de ensaio envolto em papel alumínio, e em seguida os tubos de ensaio foram incubados em shaker da marca Marconi em agitação 120 rpm (rotações por minuto) durante 30 min, no caso da *E. coli* e *P. aeruginosa* foi acrescentado DMSO a 5% e foi também incubado sob agitação por 2 h, tanto para EAM quanto para CuChlNa.

Após a agitação, alíquotas de 200 μL eram retirados e incubados em microplaca de 96 poços para cada concentração, e irradiadas pelo tempo acima determinado. Após a irradiação foi realizada diluição seriada e usou-se a diluição de 1:32 para plaqueamento e contagem de UFC, onde de cada poço era retirado 1 μL e semeado em placa com meio PCA (Ágar padrão para contagem) este permanecia em estufa a 37⁰C por 18 h, onde então era feita a contagem do numero de UFC (unidade formadora de colônia). Todas as concentrações foram feitas em duplicata, e o experimento repetido em pelo menos outras duas ocasiões.

4.6.1 Testes adicionais

Para os testes adicionais com a *P. aeruginosa* e *E. coli*, a amostra foi preparada em tubos de ensaio envolto em papel alumínio e em seguida colocada em shaker em agitação 120 rpm durante 4h em agitação. Foi acrescido DMSO a 5% e 10% (v/v) na solução com CuChlNa, nas concentrações de 5, 10, 20, 35 e 50 μM . Para *P. aeruginosa* um teste piloto qualitativo adicional foi realizado com a solução EAM com DMSO a 5% e a 10% (v/v), e também com tween 80 a 5% e 10% (v/v) nas concentrações de 50 , 100 e 150 μM .

Dos tubos que foram agitados foi retirado uma alíquota de 200 μL e colocados em microplaca de 96 poços, para cada concentração, e após a irradiação, foi realizada plaqueamento para CuChlNa, e para EAM, em meio PCA, onde este permaneceu em estufa a 37°C por 18 h, após este período de incubação era realizada a contagem de UFC.

4.6.2 Análise dos testes de Inibição do crescimento bacteriano.

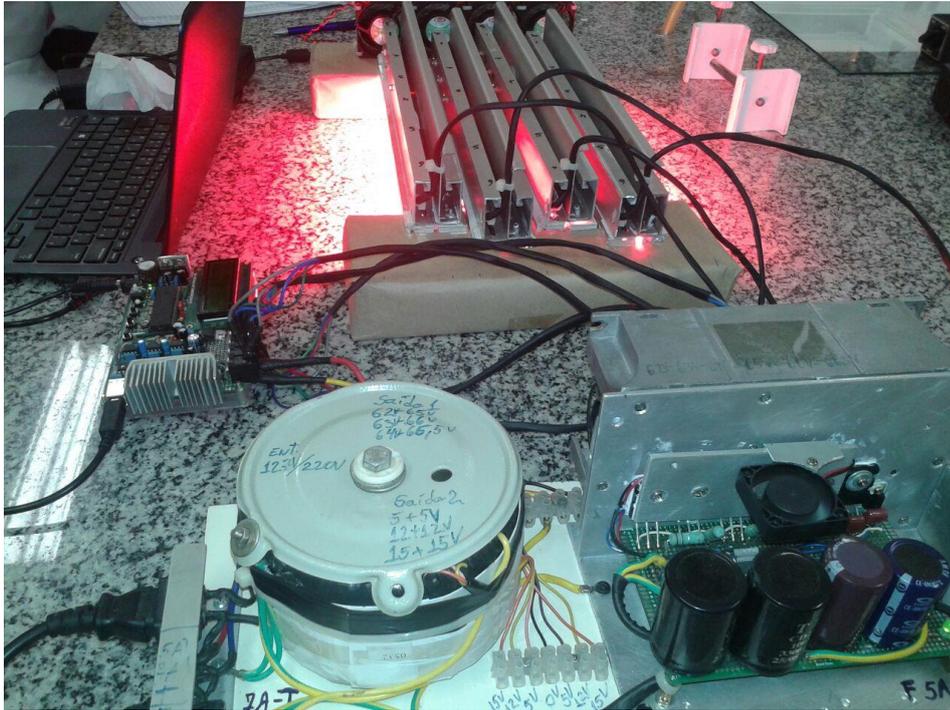
Os resultados foram obtidos a partir da média de UFC dos testes realizados em duplicata, foram determinados por meio do programa ORIGIN 8.5, considerando a média e o erro padrão (SE) da média.

4.7 Equipamentos

4.7.1 Sistema LED (homemade)

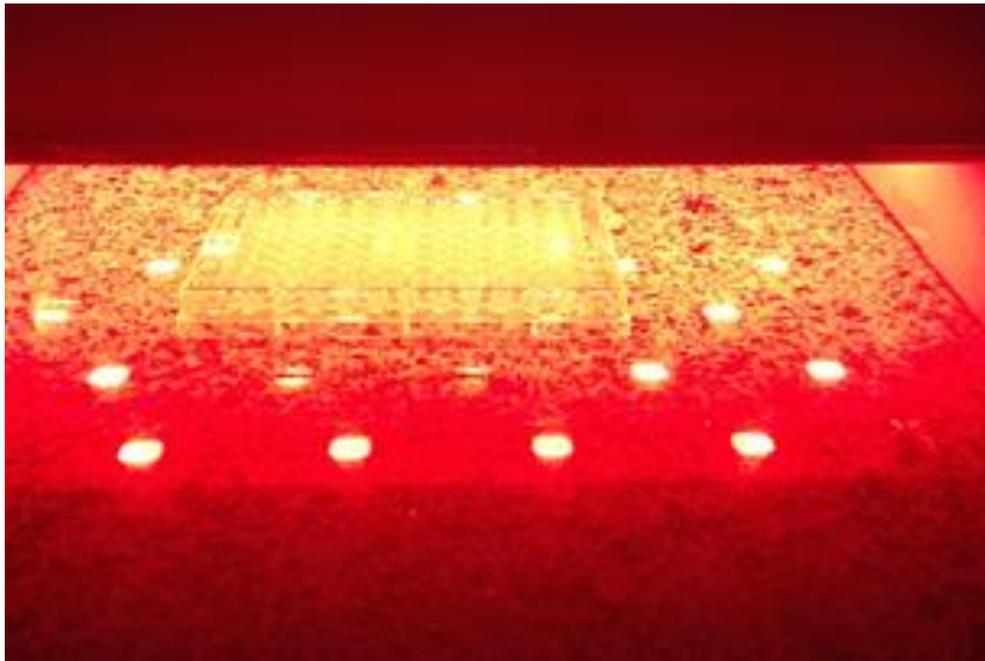
A irradiação foi feita utilizando um conjunto de LED's RGB, denominado de sistema de LED, com luz vermelha, com intensidade de $8.3 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, durante 1h, totalizando aproximadamente $30 \text{ J}/\text{cm}^2$ de dose de energia. Este sistema foi projetado e executado por pesquisadores do grupo de ótica aplicada (GOA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) mostrado na figura 14 e 15.

Figura 14 - Imagem do Sistema de LED.



Fonte: o autor.

Figura 15 – Imagem do Sistema LED durante irradiação da microplaca.



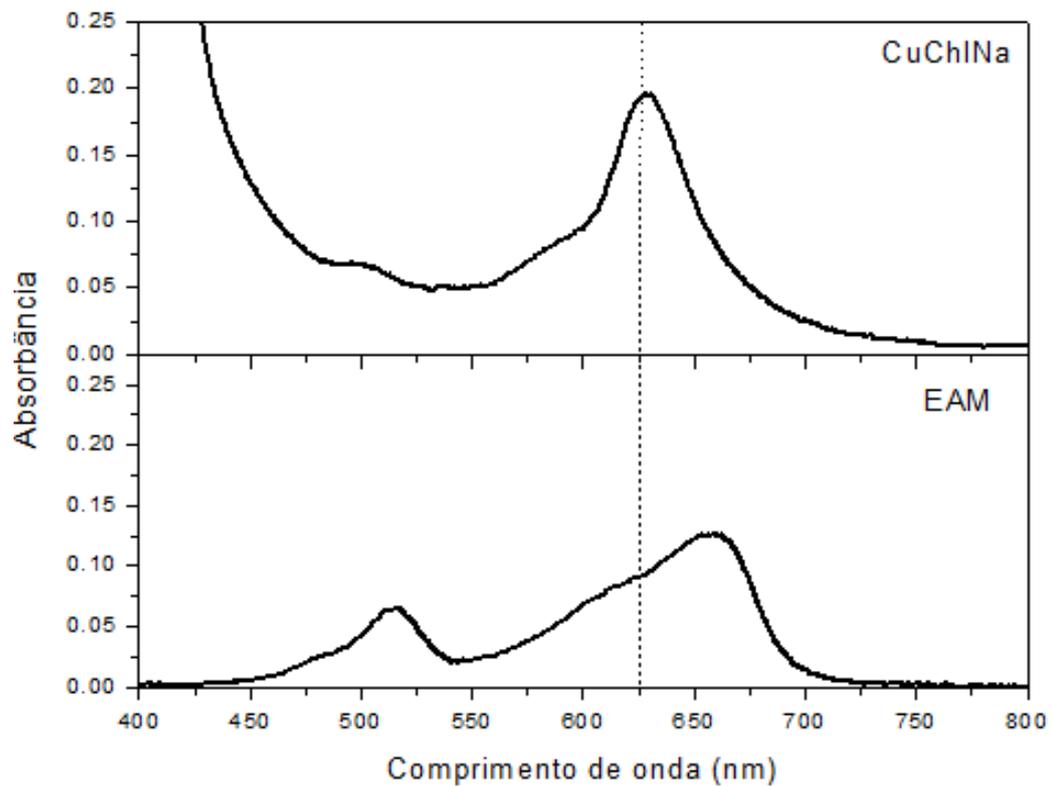
Fonte: o autor.

5 RESULTADOS

5.1 Janela Terapêutica

Os espectros de absorvância obtidos da EAM e CuChlNa estão apresentados na Figura 16. Os resultados revelaram que ambos os fotossensibilizadores apresentam uma banda de absorção bem definida no intervalo de 600 a 800 nm, sendo esta considerada a janela terapêutica fotodinâmica como desejado para uma fotoativação seletiva do fotossensibilizador pela luz vermelha.

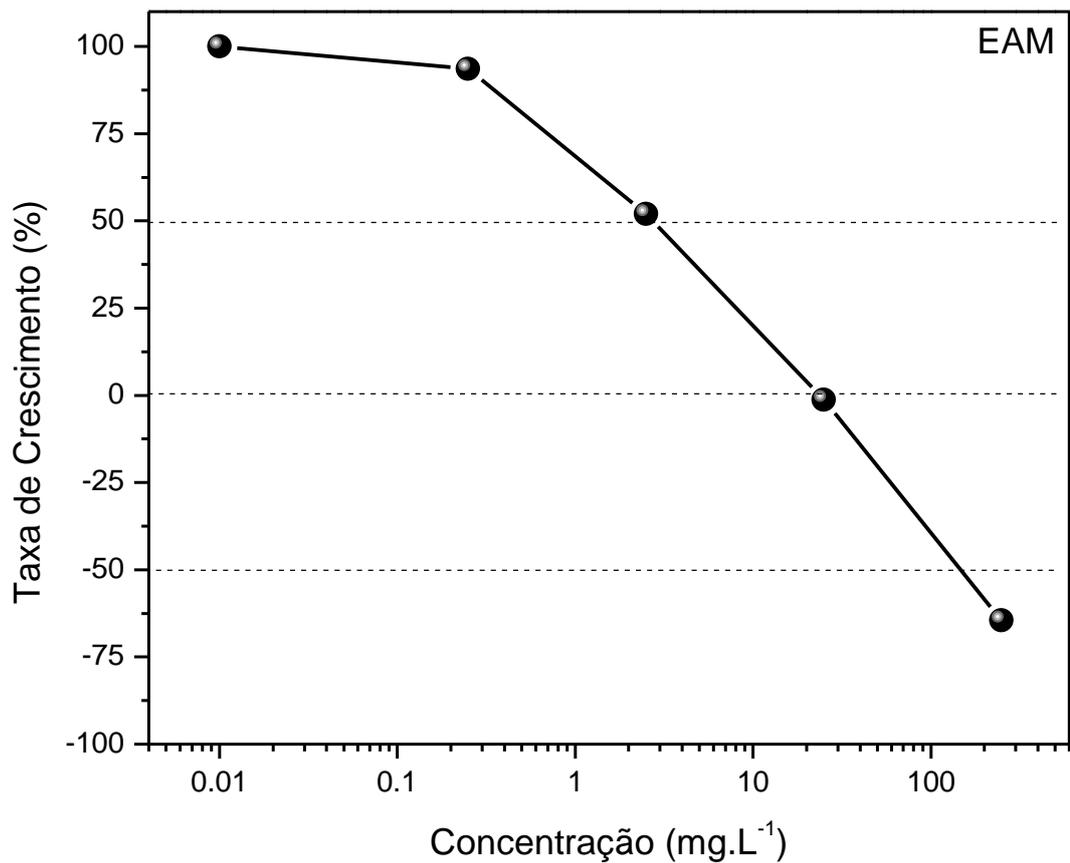
Figura 16 - Espectro de Absorção CuChlNa e EAM na concentração 20 μ M diluído em água destilada.



5.2 Citotoxicidade

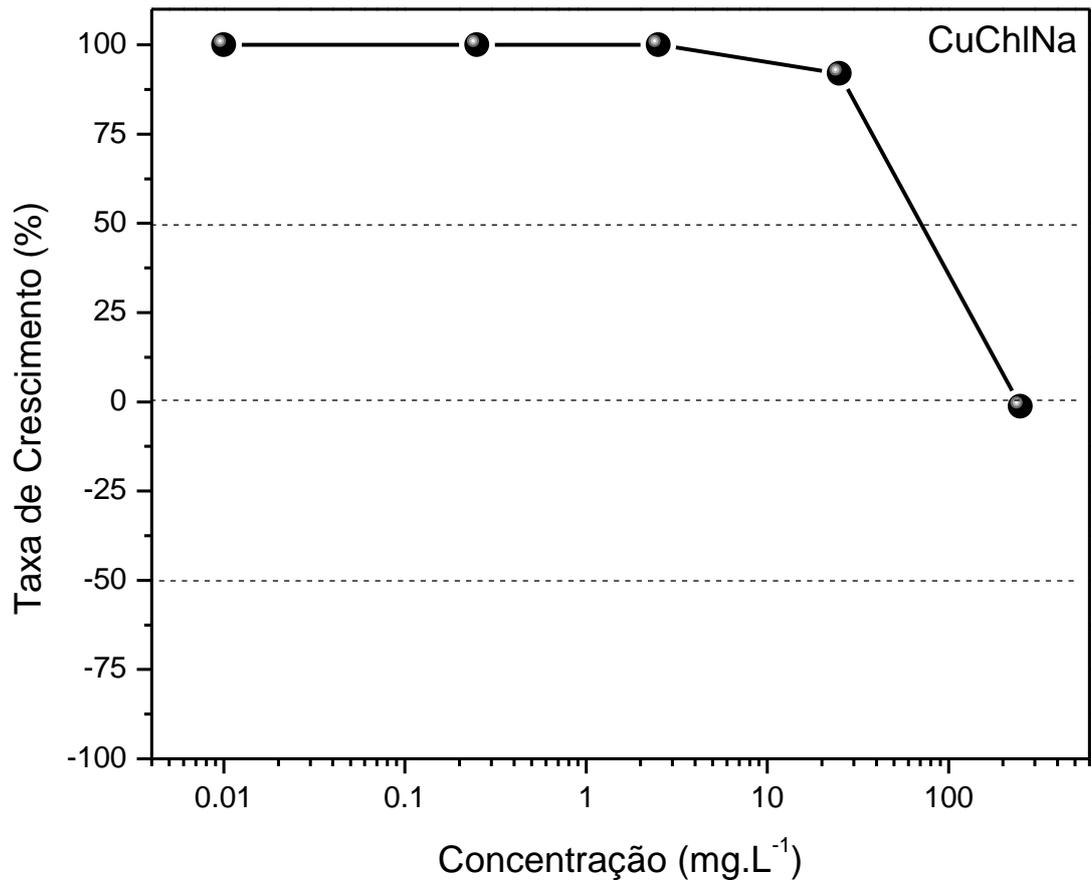
Os resultados de citotoxicidade em células de mamífero (NIH-3T3) normais revelaram que o crescimento celular foi inibido quando exposto aos fotossensibilizadores testados. Como mostrado na Figura 17, observou-se uma pequena diminuição de crescimento das células quando submetidas à concentração de 0,25 mg L⁻¹. A concentração que inibiu 50% do crescimento das células foi obtida com a concentração de aproximadamente 2,55 mg L⁻¹. Por fim, destaca-se que mesmo na maior dose do FS testado não foi induzido 100 % de morte celular, induzindo à 64 % de morte celular, ou seja, para a EAM não foi encontrada uma dose letal no intervalo de concentração testados.

Figura 17 - Curva de inibição do crescimento em células NIH-3T3 utilizando EAM.

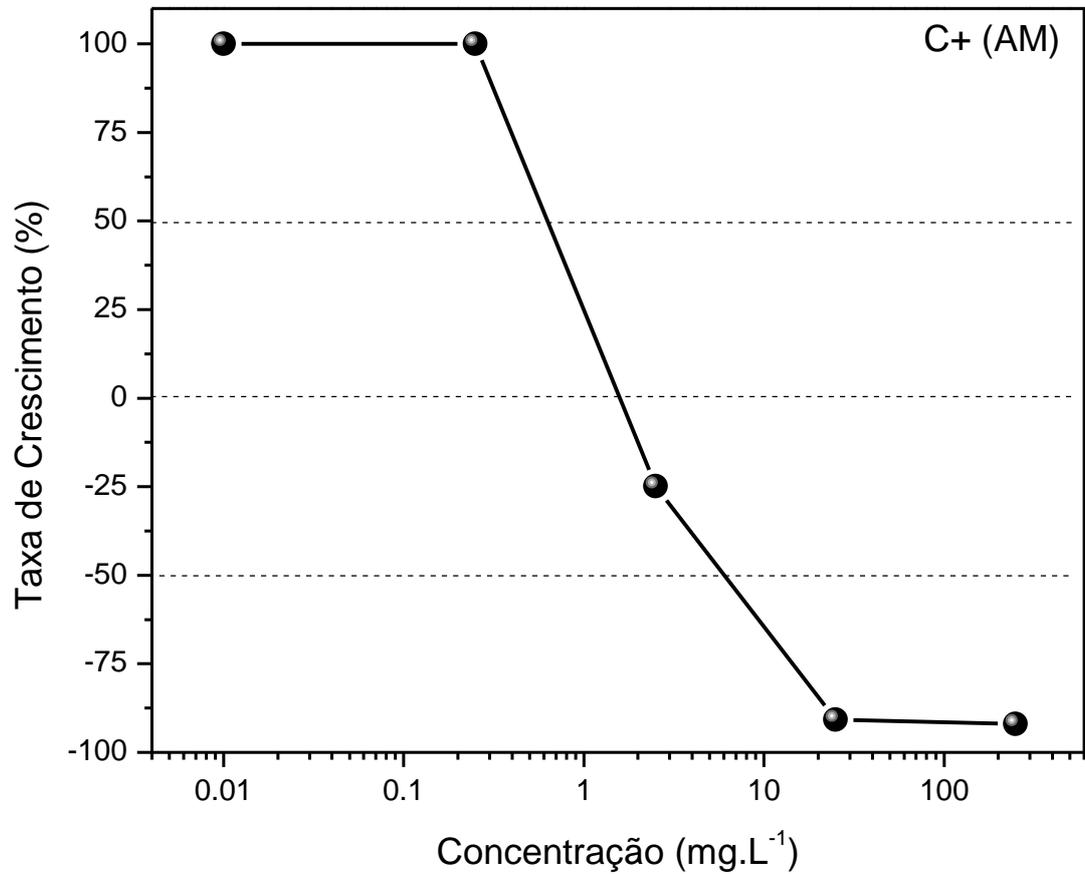


Observamos na imagem 18 que a CuChlNa apresentou IC_{50} na concentração do fotossensibilizador de $28,05 \text{ mg L}^{-1}$, onde houve uma inibição de 50% do crescimento das células, mesmo na maior concentração 250 mg L^{-1} não houve uma dose letal, onde apresentou uma morte celular de 1,25 %.

Figura 18 - Curva de inibição do crescimento em células NIH-3T3 utilizando CuChlNa.



A concentração de AM que inibiu 50% do crescimento das células foi obtida com a concentração de aproximadamente $0,61 \text{ mg L}^{-1}$, assim como demonstra a Figura 19. Por fim, destaca-se que mesmo a maior dose do FS testado não foi induziu 100 % de morte celular, induzindo 92 % de morte celular, ou seja, para a AM não foi encontrada uma dose letal no intervalo de concentração testadas.

Figura 19 - Curva de inibição do crescimento em células NIH-3T3 utilizando AM.

A tabela 1 apresenta de forma comparativa as concentrações em que houve inibição do crescimento em 50% (IC_{50}), a inibição total do crescimento (ITC) e a dose letal (DL) respectivamente para os corantes EAM, CuChlNa e AM (controle positivo).

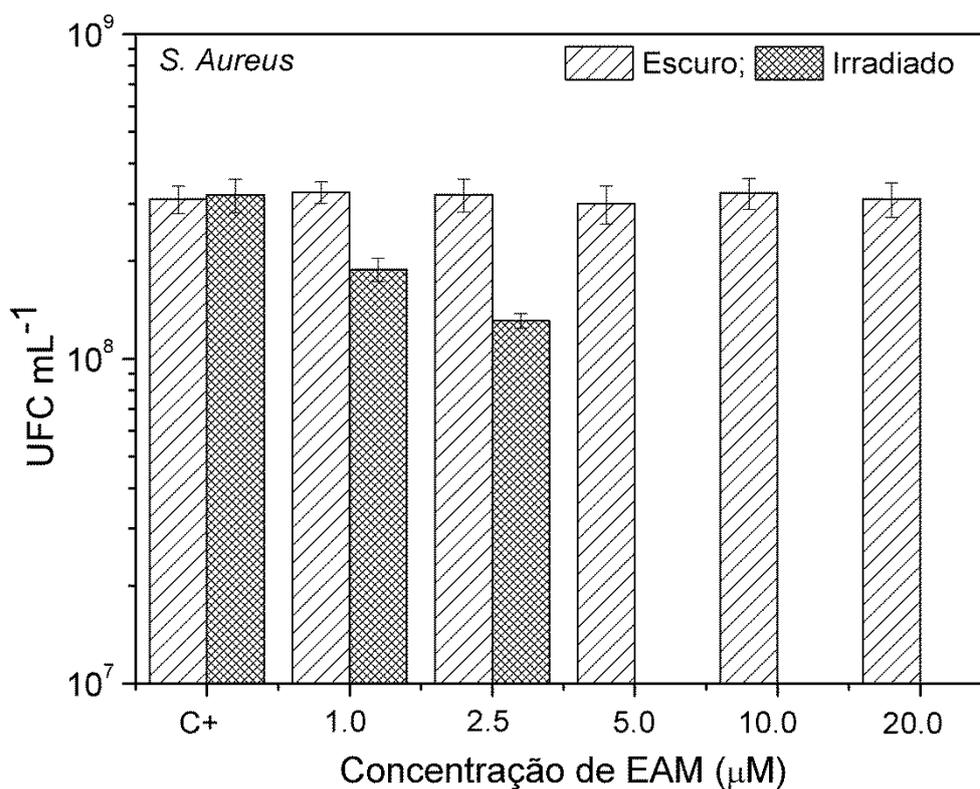
Tabela 1 - Citotoxicidade de Corantes na linhagem celular NIH-3T3.

Corante	IC_{50} (mg L ⁻¹)	ITC (mg L ⁻¹)	DL (mg L ⁻¹)
EAM (Eosina Azul de Metileno)	2,55	22,71	> 250,00
CuChlNa (Clorofilina de sódio Cuprica)	28,05	248,53	> 250,00
C+ (Azul de Metileno)	0,61	1,57	> 250,00

5.3 Inibição do Crescimento Bacteriano

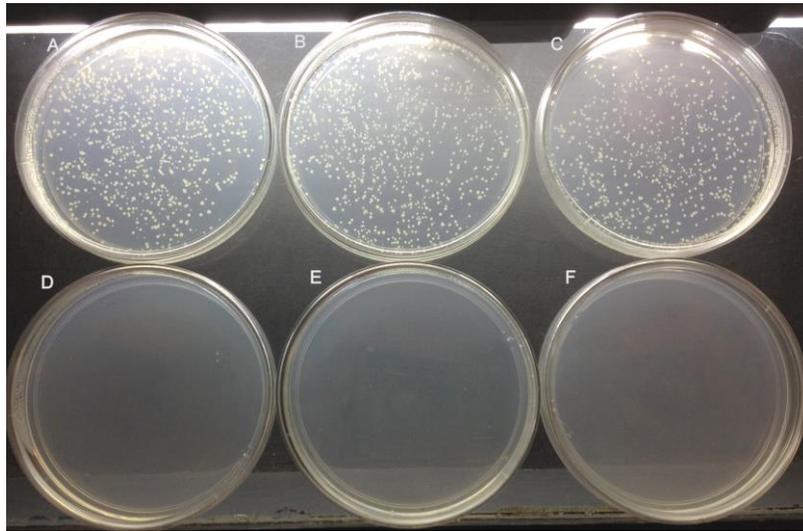
A Figura 17 mostra que EAM foi aplicado com sucesso como um FS para a inativação de *S. aureus* após a irradiação de luz vermelha para uma dose de energia de 30 J/cm^2 . Os resultados revelaram que EAM inibe completamente o crescimento bacteriano, quando utilizados em concentrações superiores a $5 \mu\text{M}$. No entanto, foi observada uma redução importante no crescimento bacteriano (40% de UFC), quando utilizado $1 \mu\text{M}$. As imagens de placas de petri, distribuídos com *S. aureus*, para os grupos irradiadas e controle, são mostrados na Figura 18 e a Figura 19, respectivamente.

Figura 20 - Unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus* em função da concentração de EAM.



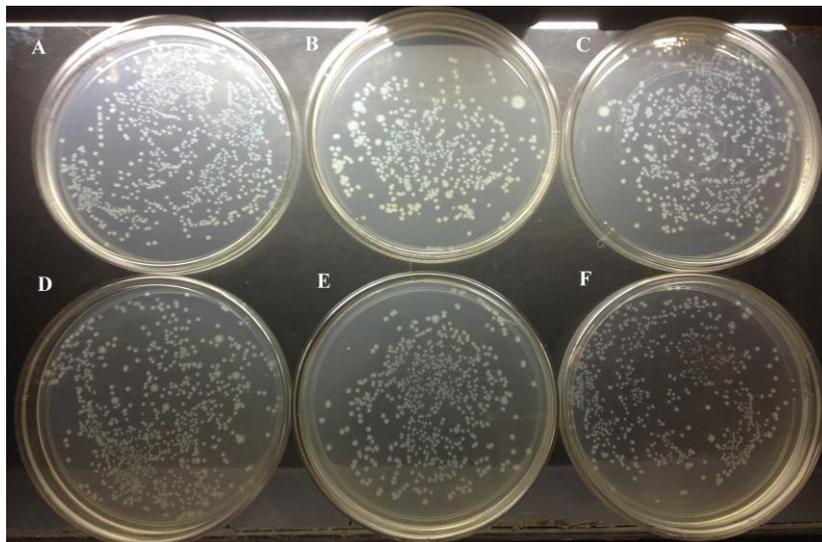
O crescimento bacteriano foi determinada após 18 h 30 J cm^2 de incubação. O grupo irradiado foi submetido a uma dose de energia de luz vermelha (625 nm).

Figura 21 - Imagem das placas de Petri contendo as unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus* para as diferentes concentrações de EAM.



Onde : (A) zero; (B) 1,0 μ M; (C) 2,5 μ M; (D) 5 μ M; (E) 10 μ M; e (F) 20 μ M. O crescimento bacteriano foi determinada após 18 h de incubação. As bactérias foram submetidas a uma dose de energia de 30/J cm² de luz vermelha (625 nm).

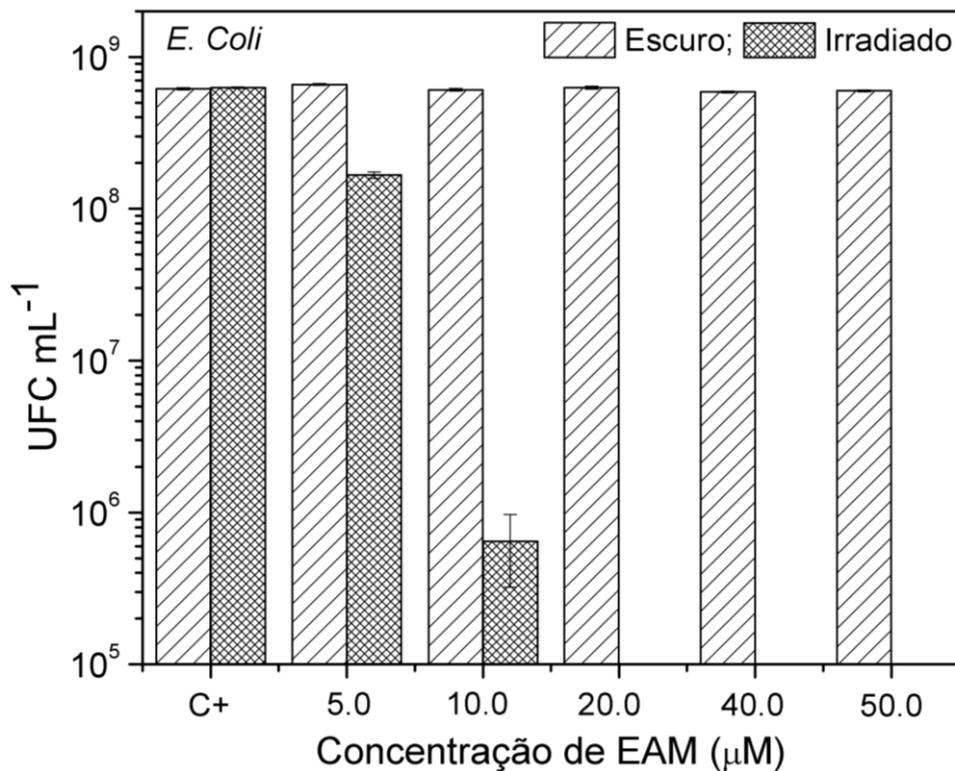
Figura 22 - Imagem das placas de Petri contendo as unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus* para as diferentes concentrações de EAM.



Onde: (A) zero; (B) 1,0 μ M; (C) 2,5 μ M; (D) 5 μ M; (E) 10 μ M; e (F) 20 μ M. O crescimento bacteriano foi determinadas após 18 h de incubação.

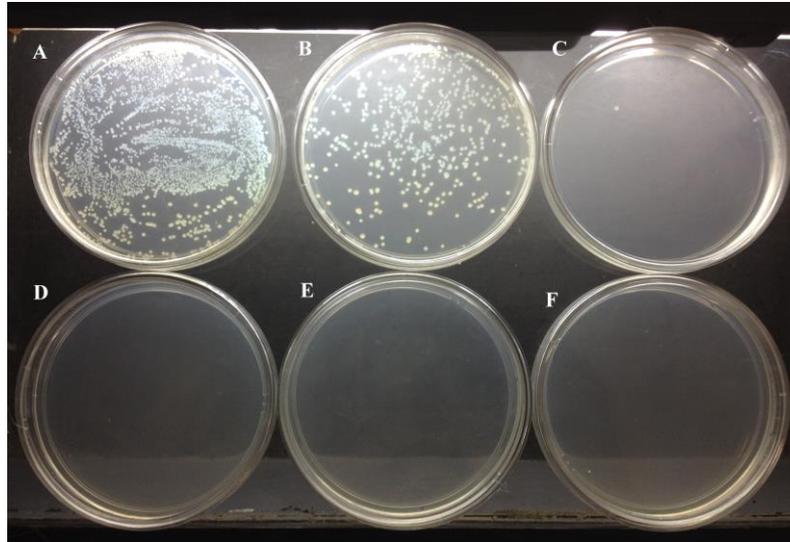
O corante Giemsa mostrou seu potencial como fotossensibilizador, como apresentado na Figura 20, o EMB inibe completamente o crescimento de *E. coli*, quando utilizada em concentrações superiores a 20 μM . Assim, à concentração crescente foi aplicada em associação com um agente de permeabilização, o DMSO, a 5% (v/v), e submetido a um tempo de incubação de 2 h (quatro vezes maior do que o utilizado para a *S. aureus*). As imagens das placas de Petri com colônias de *E. coli* estão ilustradas na Figura 21 e Figura 22, para os grupos de irradiados e não irradiados, respectivamente.

Figura 23 - Unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli* em função da concentração de EAM.



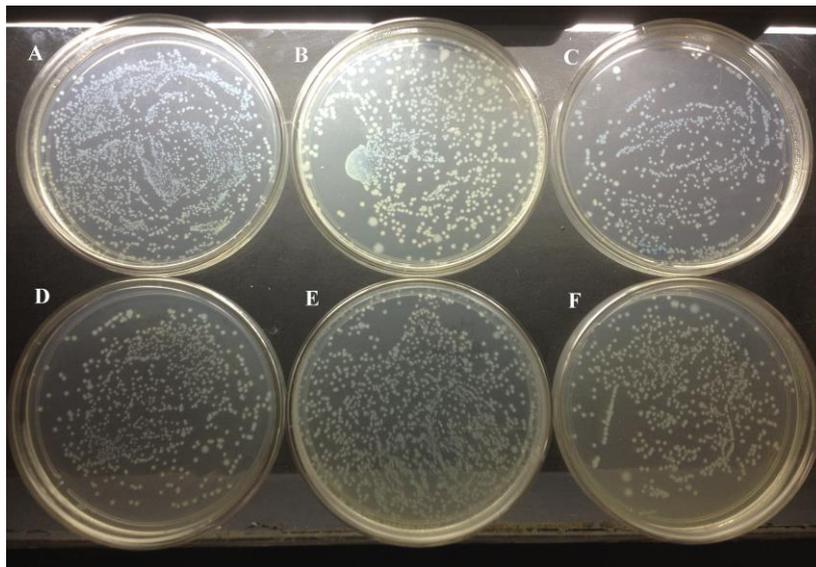
O crescimento bacteriano foi determinado após 18 h de incubação. O grupo irradiado foi submetido a uma dose de energia de 30/J cm² de luz vermelha (625 nm).

Figura 24 - Imagem das placas de Petri contendo as unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli* para as diferentes concentrações de EAM.



Onde: (A) zero; (B) 5 μM ; (C) 10 μM ; (D) 20 μM ; (E) 40 μM ; e (F) 50 μM . O crescimento bacteriano foi determinada após 18 h de incubação. As bactérias foram submetidas a uma dose de energia de 30/J cm^2 de luz vermelha (625 nm).

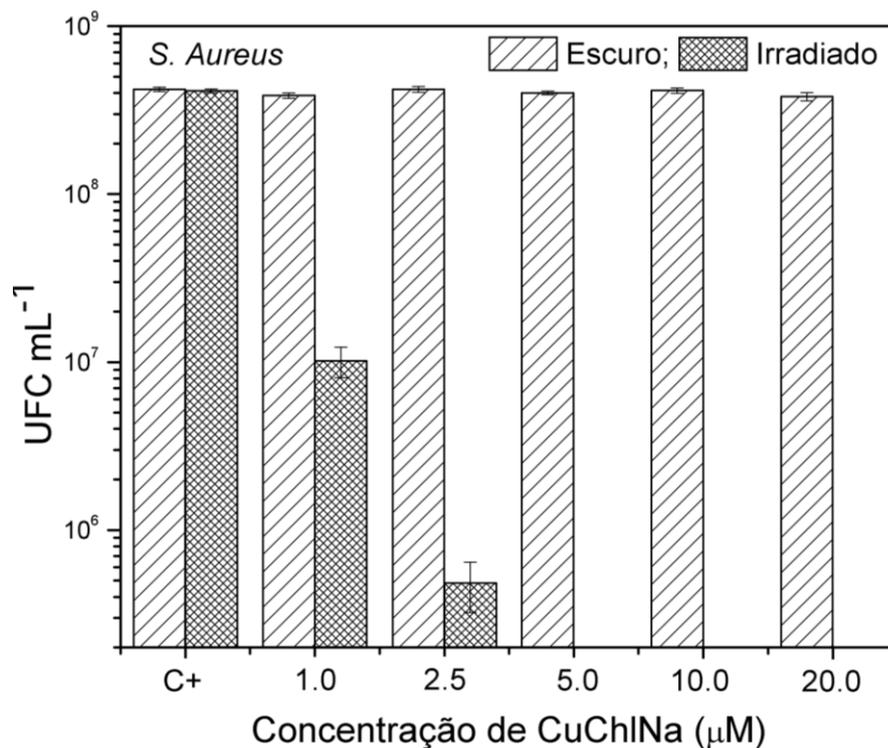
Figura 25 - Imagem das placas de Petri contendo as unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli* para as diferentes concentração de EAM.



Onde: (A) zero; (B) 5 μM ; (C) 10 μM ; (D) 20 μM ; (E) 40 μM ; e (F) 50 μM . O crescimento bacteriano foi determinadas após 18 h de incubação. As bactérias não foram submetidas à irradiação.

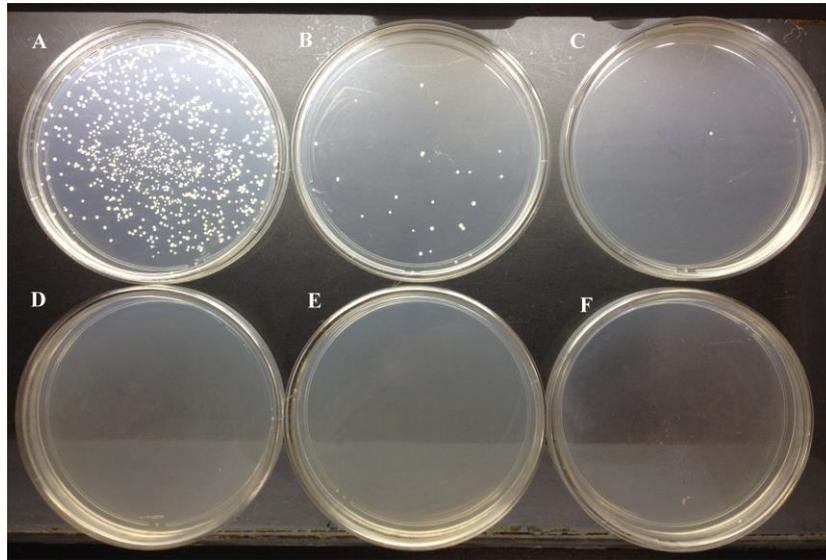
Os resultados obtidos mostraram que a CuChlNa pode ser aplicada como um FS eficaz para a fotoinativação de *S. aureus* quando iluminado por luz vermelha, tal como apresentado na Figura 23. Estes resultados demonstram que o crescimento bacteriano foi completamente inibido em concentrações acima de 5 μM do FS. No entanto, foi observada uma redução significativa no UFC mesmo em 1 μM . Além disso, a Figura 25 também revelou que CuChlNa foi não-tóxico no escuro para todas as concentrações testadas. As imagens das placas de Petri com colônias de *S. aureus*, para os grupos escuro e irradiadas, são mostrados na Figura 24 e Figura 25, respectivamente. No entanto, a fotoinativação com a CuChlNa não foi atingida nos testes realizados com as bactérias Gram-negativas (dados não mostrados).

Figura 26 - Unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus* em função da concentração de CuChlNa.



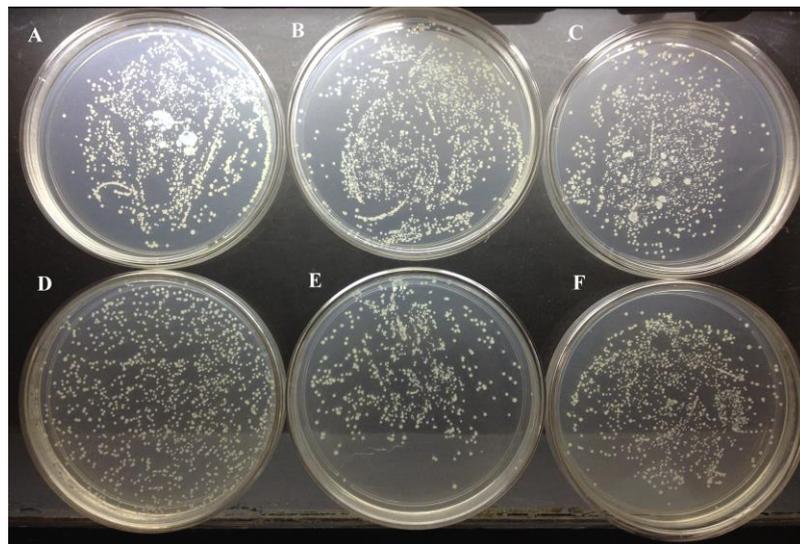
O crescimento bacteriano foi determinada após 18 h de incubação. O grupo irradiado foi submetido a uma dose de energia de 30 J cm^2 de luz vermelha (625 nm).

Figura 27 - Imagem das placas de Petri contendo as unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus* para as diferentes concentração de CuChlNa.



Onde : (A) zero; (B) 1,0µM; (C) 2,5µM; (D) 5 µM; (E) 10 µM; e (F) 20 µM. O crescimento bacteriano foi determinadas após 18 h de incubação. As bactérias foram submetidas a uma dose de energia de 30/J cm² de luz vermelha (625 nm).

Figura 28 - Imagem das placas de Petri contendo as unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus* para as diferentes concentração de CuChlNa.



Onde: (A) zero; (B) 1,0µM; (C) 2,5µM; (D) 5 µM; (E) 10 µM; e (F) 20 µM. O crescimento bacteriano foi determinadas após 18 h de incubação. As bactérias não foram submetidas à irradiação.

6 DISCUSSÃO

Dada a emergente necessidade de alternativas de controle de crescimento de bactérias envolvidas em processos infecciosos, faz-se necessário que se proponham novas alternativas, pois caso nada seja feito teremos um problema devastador em 2050 (O'NEILL, 2016).

Estudos utilizando FS como fotoinativadores têm sido publicados como uma alternativa promissora na inibição do crescimento de certos patógenos como *S. aureus*; *E. coli* e *P. aeruginosa* (HASHIMOTO *et al.*, 2009; HUANG, *et al.*, 2010; TANG, *et al.*, 2007; WAINWRIGHT, *et al.*, 2016). Desta forma este trabalho vem propor um novo FS (EAM) e um pouco explorado (CuChlNa) para a inativação fotodinâmica.

Os espectros de absorbância feitos para os FS testados revelaram que ambos apresentam banda de absorção bem definida no intervalo de 600 a 800 nm, portanto dentro da janela terapêutica fotodinâmica. Vale a pena salientar que um coeficiente de absorção molar elevada na região do vermelho é uma das características desejáveis para um FS eficaz, pois a luz dentro deste intervalo de comprimentos de onda penetra melhor no tecido (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010; KALKA, *et al.*, 2000).

Nossos resultados mostram que ambos os FS, EAM e CuChlNa, foram menos tóxicos do que o composto de controle positivo (C+), um FS altamente usado, e comercialmente disponível. Um valor IC₅₀ de 0,61; 2,55 e 28,05 mg, foi determinado para o controle positivo (C+) AM, EAM, e CuChlNa, respectivamente. Estes resultados demonstram que o C+ é cerca de 4 e 45 vezes mais citotóxico que o EAM e CuChlNa, respectivamente, revelando que um uso potencial de CuChlNa e EAM como FS comerciais não será limitado pela sua toxicidade em mamíferos. Além disso, os resultados também mostraram que não foi encontrada uma dose letal no intervalo de concentrações testado (0,25 a 250 mg L⁻¹).

Com relação à inibição do crescimento bacteriano, nossos resultados estão em conformidade com as descobertas relatadas por Tang, *et al* (2007) e colaboradores, onde observou-se que uma maior concentração de FS foi necessária para inibir o crescimento de *E. coli* (ATCC 25922) em relação a *S. aureus* (ATCC 25923). Eles demonstraram que a *S. aureus* foi fotoinativada utilizando Azul de Toluidina (AT), como FS, a 80 µM, quando irradiada a 30 J/cm² com a luz vermelha (600 nm). Em contraste, foi necessária uma concentração de 400 µM de AT (cinco vezes mais elevada) para a fotoinativação de *E. coli* com a mesma dose de luz.

Normalmente um agente de permeabilização adicional é necessário para uma eficiente fotoinativação de bactérias gram-negativas (SPERANDIO, 2013). Neste trabalho, a

concentração crescente foi aplicada em associação com um agente de permeabilização, o DMSO, a 5% (v/v) e submetido a um tempo de incubação de 2 h (quatro horas maior que o tempo utilizado para *S. aureus*).

Huang, *et al.* (2010) mostraram que o azul de metileno (AM) pode ser utilizado de forma eficiente para a fotoinativação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, demonstrando que o *S. aureus* era muito mais fácil de inibir com IFD que a *P. aeruginosa*. Eles mostraram que *S. aureus* foi efetivamente eliminadas (superior a seis logs de mortalidade) com concentrações AM superiores a 10 μM , quando irradiadas com 10 J/cm^2 de 660 nm de luz. No entanto, AM em concentração inferior a 1,000 μM foi ineficaz na fotoinativação da *P. aeruginosa* sob quaisquer condições. O AM foi aplicado com sucesso como FS para *P. aeruginosa* quando usado mais de 1.000 μM e irradiados a 320 J/cm^2 . No entanto, antes da irradiação, a suspensão bacteriana foi lavada por centrifugação e depois ressuspendidas para evitar a blindagem óptica das bactérias pela solução concentrada MB elevada (HUANG, *et al.*, 2010). Todavia este procedimento experimental fica inviável para uma aplicação clínica.

Um dos motivos da dificuldade encontrada por vários autores em inativar *P. aeruginosa* reside no fato de que ela possui um mecanismo ativo existente denominado bomba de efluxo que protege a bactéria contra moléculas prejudiciais. Este sistema de efluxo é responsável por expulsar antibióticos, desinfetantes, substâncias tóxicas ou metabólitos secundários (NEVES, 2011).

No presente estudo esta também foi uma dificuldade encontrada com a bactéria *P. aeruginosa*, pois não obtivemos qualquer sucesso na fotoinativação nas condições experimentais testadas, corroborando com Huang, *et al.*, (2010) onde o mesmo coloca que a *P. aeruginosa* é muito difícil de ser eliminada.

Tendo em vista o sucesso do uso do EAM com *E. coli* foram feitas várias tentativas de se inibir o crescimento através da IFD, com aumento da concentração do corante em até três vezes e até mesmo da mudança do desestabilizador de membrana, Hashimoto *et al.* (2009) também observou dificuldade em inibir o crescimento da *P. aeruginosa* através da IFD sendo esta muito mais difícil de inativar que as demais espécies de bactérias.

É importante ressaltar que os nossos resultados também mostraram que EAM era não-tóxico no escuro, tanto para o *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* para todas as concentrações testadas, mesmo com concentração elevada (50 μM) contendo 5% (v/v) do agente de permeabilização.

Apesar da pouca informação na literatura sobre o uso de CuChlNa como fotossensibilizador, Luksiene e colaboradores (2010) demonstraram recentemente que CuChlNa foi capaz de fotoinativar uma bactéria gram-positiva, o *Bacillus cereus* (ATCC 12826), *in vitro*, utilizando uma irradiação de luz azul (a 400 nm), onde houve uma redução de cerca de 4 logs de crescimento bacteriano quando usado 7,5 μM .

López-Carballo *et al.* (2008) também avaliou o potencial CuChlNa como fotossensibilizador para IFD, utilizando *S. aureus* CECT 86, *L. monocytogenes* CECT 934, *E. coli* CECT 515 e *Salmonella spp.* CECT 409 adicionando o CuChlNa diretamente em meio de cultura. Como observado em nosso estudo, os autores descobriram que CuChlNa foi apenas de forma eficaz para fotoinativação de bactérias gram-positivas.

Os resultados revelaram que tanto EAM e CuChlNa foram capazes de fotoinativar *S. aureus*, apresentando fototoxicidade semelhante sob iluminação de luz vermelha onde o crescimento bacteriano foi completamente inibido para as concentrações de FS maiores que 5 μM quando irradiado a 30 J/cm^2 . Entretanto, a EAM foi bem sucedida aplicada para fotoinativação tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus*. Todavia, uma abordagem experimental diferente teve que ser encontrada devido à existência da membrana externa das bactérias gram-negativas, sendo mais difícil a penetração (permeação) do FS para dentro das células. Consequentemente, comparando os efeitos de IFD do EMB em *E. coli* e *S. aureus*, o crescimento de *E. coli* foi completamente inibida quando se associa a um período de incubação de FS (120 min) e uma concentração de FS (mais de 20 μM) 4 vezes superior à utilizada para *S. aureus*.

Apesar da configuração experimental semelhante, utilizando agentes de permeabilização em associação com maior tempo de incubação e concentração do FS, para CuChlNa contra *E. coli* e *P. aeruginosa* não houve efeito fotodinâmico. Apesar dos bons resultados em *S. aureus*, *E. coli* o corante EAM não apresentou nenhum efeito de fotoinativação com a *P. aeruginosa*, mesmo com maior tempo de incubação de 4 h, mudança do agente permeador da membrana e aumento da concentração do corantes em até 3 vezes.

A fotoinativação eficiente induzida por EMB, tanto para bactérias Gram-positivas quanto para bactérias Gram-negativas (exceto *P. aeruginosa*), pode estar relacionada com o fato de a CuChlNa ser um corante aniônico, a EAM é uma mistura de corantes contendo um corante catiônico na sua formulação. Consequentemente, a EAM pode interagir de forma mais eficiente com as bactérias porque, em geral, as células microbianas tem uma carga negativa

pronunciada, e o corante utilizado possui estrutura química catiônica, que é determinante para ser um bom FS (HAMBLIN, 2016).

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que EAM e CuChlNa tem um grande potencial para aplicação em Inativação Fotodinâmica, pois apresenta um elevado coeficiente de absorção molar na região de 600-800, produzindo bons rendimentos de espécies reativas de oxigênio e não apresentando toxicidade no escuro.

As análises de citotoxicidade em células de mamíferos revelaram que ambos os corantes podem ser utilizados como fotossensibilizadores comerciais.

Os resultados mostraram que a EAM e CuChlNa podem ser usados eficientemente como fotossensibilizadores para a fotoinativação de *S. aureus*. No entanto, os dados mostraram que CuChlNa só foi capaz de fotoinativar a bactéria Gram-positiva testada. Ambos os fotossensibilizadores foram capazes de inibir completamente o crescimento bacteriano em baixa concentração (5 μM) sob iluminação de luz vermelha a 30 J cm^{-2} . No entanto, a fotoinativação da *E. coli* só foi efetiva quando utilizada concentrações mais elevadas (mais de 20 μM) de EAM, e associado a um agente de permeabilização e expondo as células microbianas por um período de incubação mais longo. Todavia para estas condições experimentais testadas, nenhum dos fotossensibilizadores foi capaz de fotoinativar *P. aeruginosa*.

Novos estudos são necessários para investigar os processos de internalização destes corantes pelas bactérias, e também testa-los em bactérias com resistência a antibióticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANIS, A. J. Resistance to Antibiotics: Are we in the Post-Antibiotic Era? **Archives of Medical Research**, v.36, n.6, p.697-705, nov./dec. 2005.

ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st century-A clinical super-challenge. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 5, p. 439-443, jan. 2009.

BARCIA, J. J. The Giemsa Stain: Its History and Applications. **International Journal of Surgical Pathology**, p. 292-296, v. 15, n. 3, July 2007.

BARTOLOMEU, M.; ROCHA, S.; CUNHA, Â.; NEVES, M. G. P. M. S.; FAUSTINO, M. A. F., ALMEIDA, A. Effect of Photodynamic Therapy on the Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-11, mar. 2016.

BBC NEWS. Poots reveals 26 Pseudomonas deaths in four years. Disponível em: <<http://www.bbc.com/news/uk-northern-ireland-17047276>> Feb. 2012. Acesso em outubro de 2016.

BRAMMER, S. P.; TONIAZZO, C.; POERSCH, L. B. Corantes comumente empregados na citogenética vegetal. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.82, p. 1-8, 2015.

BLACK, J. G. Microbiologia fundamentos e perspectivas, Rio de Janeiro, 4 ed. Guanabara Koogan, 2013.

BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. Microbiologia Médica de Jawetz, Melnik e Adelberg, 25 ed. Porto Alegre, 2012.

CALZAVARA-PINTON, P.G.; VENTURINI, M.; SALA, R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: **Photochemistry and photobiology**. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 21, p. 293-30, 2007.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Newsroom Image Library - Disease Agents < <https://www.cdc.gov/media/subtopic/library/diseases.htm>>. Acesso em outubro, 2016.

CORAZZA, A. V. **Fotobiomodulação comparativa entre o laser e o LED de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutâneas em ratos**. 2005. 89f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia). Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química, USP, São Carlos, 2010.

COTTER, J. **100 people fall ill from *E. coli* linked to raw pork products in Alberta**. Disponível em: <<http://www.ctvnews.ca/health/100-people-fall-ill-from-e-coli-linked-to-raw-pork-products-in-alberta-1.1992720>>. Sept. 2014. Acesso em: 22 de set. de 2016.

DEMINOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2329-2335, June. 2005.

DOLMANS, D.E.J.G.J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews**, v.3, p. 380-387, may 2003.

DURANTINI, E. N. Photodynamic Inactivation of Bacteria. **Current Bioactive Compounds**, v. 2, p.127-142, 2006.

FERNANDES, M. R.; MOURA, Q.; SARTORI, L.; SILVA, K. C.; CUNHA, M. P.; ESPOSITO, F.; LOPES, R.; OTUTUMI, L. K.; GONÇALVES, D. D.; DROPA, M. ; MATTÉ, M. H.; MONTE, D. F.; LANDGRAF, M.; FRANCISCO, G. R.; BUENO, M. F.; GARCIA, D. O.; KNÖBL, T.; MORENO, A. M.; LINCOPAN, N. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. **Euro Surveillance**, v.21, n.17, 2016.

FERNANDES, M. R.; MCCULLOCH, J. A.; VIANELLO, M.; MOURA, Q.; PÉREZ-CHAPARRO, P. J.; ESPOSITO, F.; SARTORI, L.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; LIRA, D. P. A.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. First Report of the Globally Disseminated IncX4 Plasmid Carrying the *mcr-1* Gene in a Colistin-Resistant *Escherichia coli* Sequence Type 101 Isolate from a Human Infection in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n.10, p. 6415-17, oct., 2016.

FOSTER T. (1996) *Staphylococcus*. **Medical Microbiology** 4 ed. (Edited by Baron S.), Chapter 12 pp 1-22. Galveston, University of Texas Medical Branch at Galveston Disponível em: <>. Acesso em: 28 ago. 2016.

FRIEDEN, T. **Centers for Disease Control and Prevention**. Antibiotic resistance threats in the United States. Disponível em: www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf.

FRESHNEY, I. R. Culture of animal cells. **A manual of Basic Technique**. 5 ed. New York: Wiley-Liss, 2005.

GEORGE, S.; HAMBLIN, M. R.; KISHENA, A. Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 8, n.6, p. 788-795, June, 2009.

GEROLA, A. P. **Estudos físicos-químicos de derivados de clorofila em sistemas homogêneos e micro-heterogêneos: aspectos fotofísicos, fotodinâmicos e fotoinativantes sobre micro-organismos**. 2010. 107f. Dissertação (Mestrado em Química). Faculdade de Química. UEM, Maringá, 2010.

GIULIANI, F.; MARTINELLI, M.; COCCHI, A.; ARBIA, D.; FANTETTI, L.; RONCUCCI, G. In Vitro Resistance Selection Studies of RLP068/Cl, a New Zn(II) Phthalocyanine Suitable for Antimicrobial Photodynamic Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 637-642, Feb. 2010.

GURGEL, C. V. **Ação da clorofila como fotossensibilizador e do led como fonte alternativa na fototerapia dinâmica antimicrobiana contra o *Enterococcus Faecalis***. 2013. 99f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia. USP, 2013.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436-450, 2004.

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

HASHIMOTO, M. C. E.; TOFFOLI D. J.; PRATES R. A.; COURROUL L. C.; RIBEIRO M. S. Photodynamic inactivation of antibiotic resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in vivo. **SPIE: Photodynamic Therapy: Back to the Future**, v.7380, July 2009.

HIRAMATSU, K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. **The Lancet infectious diseases**, v. 1, n. 3, p. 147–155, oct., 2001.

HUANG, L.; DAI, T.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial Photodynamic Inactivation and Photodynamic Therapy for Infections. **Methods in Molecular Biology** 635, p. 155–173, January 2010.

HUMPHREY, A. M. Chlorophyll. **Food Chemistry**, v. 5, p. 57-67, 1980.

IGLEWSKI, B. H. *Pseudomonas*. **Medical Microbiology** 4 ed. (Edited by Baron S.), Chapter 27 pp 1-15. Galveston, University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996, disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8448/>>. Acesso 28 ago. 2016.

INGRAHAM, J. L.; INGRAHAM, C. A. **Introdução à microbiologia**: uma abordagem baseada em estudos de casos. Cengage Learning, 3. ed., 2010.

ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão de literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 4, p. 501-511, jul./ago. 2010.

KALKA, K.; MERK, H.; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatolog**, .v.42, n.3, p.389-413 Mar. 2000.

KIM, M.; JUNG, H. Y.; PARK, H. J. Topical PDT in the Treatment of Benign Skin Diseases: Principles and New Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, 16, p. 23259-23278, sep. 2015.

LAXMINARAYAN, R.; DUSE, A.; WATTAL, C.; ZAIDI, AK.; WERTHEIM HF; SUMPRADIT, N.; VLIEGHE, E.; HARA, GL.; GOULD, IM.; GOOSSENS, H.; GREKO, C.; SO AD; BIGDELI, M.; TOMSON G.; WOODHOUSE W.; OMBAKA, E.; PERALTA, A. Q.; NAZ QAMAR, F.; MIR, F.; KARIUKI, S.; QAR A BHUTTA, Z.; COATES, A.; BERGSTROM, R.; WRIGHT, G. D.; D BROWN, E.; CARS, O. Antibiotic resistance—the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases Commission**, v.13, p.1057-1098, dec. 2013.

LINS, R. D. A. U.; DANTAS, E. M.; LUCENA, K. C. R.; CATÃO, M. H. C. V.; GRANVILLE-GARCIA, A. F.; CARVALHO NETO, L. G. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. **Anais brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 6, p. 849-55, 2010.

LIU Y.; WANG Y.; WALSH, T. R.; YI, L.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, D.; ZHOU, H.; LIANG, Z.; LIU, J.; SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism

MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, 161–68, 2016.

LÓPEZ-CARBALLO, G.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; GAVARA, R.; AND OCIO, M. J. Photoactivated chlorophyllin-based gelatin films and coatings to prevent microbial contamination of food products. **Int. J. Food Microbiol.** 126, p. 65-70, 2008.

LUKSIENE, Z.; BUCHOVEC, I.; AND PASKEVICIUTE, E. Inactivation of *Bacillus cereus* by Na-chlorophyllin-based photosensitization on the surface of packaging. **Journal of Applied Microbiology**, 109, p. 1540–1548, 2010.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237-243, mar./abr. 2000.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

MEJIA, C.; ZURITA, J.; GUZMAN-BLANCO, M. Epidemiologia e vigilância de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 14, p. 79-86, Dec. 2010 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702010000800003&lng=en&nrm=iso>. Acesso 24 Jan. 2017.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLET, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; RAY, G. M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a High- Flux Anticancer Drug Screen Using Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. **National Cancer Institute**, 83, p. 757-766, 1991.

MURRAY, P. R. **Microbiologia médica**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E. M.; LEVY, C.E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 409-420, ago. 2011.

NITZAN, Y.; GUTTERMAN, M.; MALIK, Z.; EHRENBERG, B. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. **Photochemistry and Photobiology**, 55, p. 89-96, 1992.

NOGUEIRA, J. M. D. R.; SOUZA, L. D. F. Bacteriologia. In: Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. v. 4. Rio de Janeiro: EPSJV,IOC, Fundação Oswaldo, 2009. p. 221-397. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/15170>> Acesso em : 10 jan. 2017.

OLIVEIRA, K. T.; SOUZA, J. M.; GOBO, N. R. S.; ASSIS, F. F.; BROCKSOM, T. J. Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotosensibilizadores do tipo porfirinas, clorinas e ftalocianinas em terapias fônicas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 310-335, out. 2015.

O'NEILL J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. The review on antimicrobial resistance; London: HM Government and the Wellcome Trust; 2016.

ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. **Materials**, v. 6, n. 3, p. 817-840, mar. 2013.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988-994, jul./ago. 2007.

PIRES, E. J. V. C.; SILVA V. V. JR; LOPES A. C. S.; VERAS D. L.; LEITE L. E.; MACIEL M. A. V. Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospital universitário. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 21, n. 4, p. 384-390, out./dez. 2009.

RAAB, O. Uber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. **Zeitung Biologic**, 39, p. 524-546, 1900.

RIBEIRO, J.N.; FLORES A. V. Terapia fotodinâmica: uma luz na luta contra o câncer. **Physicae**, ano 5, v. 5 p. 5-14, jan. 2005.

RIBEIRO, A. V. F. N.; SILVA, A. R.; NOVAES, G. P.; BELISÁRIO, M.; JORGE, R. A.; RIBEIRO, J.N. Substâncias ativadas pela luz: potentes armas na batalha contra o câncer, jan. 2008, disponível em <<http://www.researchgate.net/publication/253645799>>. Acesso em

ROBERTSON. V.; WARD, A.; LOW, J.; REED, A. Radiação visível e infravermelha. In: Eletroterapia Princípios e Prática, 4 ed., Rio de Janeiro, 2009.

RUNCIE, H. Infection in a Pre-Antibiotic Era. **Journal of Infectious Diseases Preventive Medicine**, v. 3, n.2, 125, july, 2015.

SHARIFF, V. A. A. R.; SHENOY, M. S.; YADAV, T. M. R. The antibiotic susceptibility patterns of uropathogenic Escherichia coli, with special reference to the fluoroquinolones. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 6, p. 1027-1030, 2013.

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 10, p. 813-823, oct. 2006.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n.13, p. 1107-1112, 1990.

SPERANDIO, F. F.; HUANG, Y.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Kill Gram-negative Bacteria. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 8, n. 2, p. 108-120, 2013.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p.748-755, maio/jun. 2005.

TANG, H. M.; HAMBLIN, M. R.; YOW, C.M.N. A comparative in vitro photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogens. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.13, n.2, p. 87-91, apr. 2007.

TAVARES, A.; CARVALHO, C. M. B.; FAUSTINO, M. A.; NEVES, M. G. P. M. S.; TOMÉ, J. P. C.; TOMÉ, A. C.; CAVALEIRO, J. A. S.; CUNHA, Â.; GOMES, N. C. M.; ALVES, E.; ALMEIDA, A. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment. **Marine Drugs**, v.8, n.1, p. 91-105, 2010.

UCHOA, A. F.; KONOPKO, A. M.; BAPTISTA, M. S. Chlorophyllin Derivatives as Photosensitizers: Synthesis and Photodynamic Properties. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 12, p. 2615-2622, 2015.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharmacy and Therapeutics**. v.40, n. 4, p. 277- 83, apr., 2015.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.20, n.1, p. 157-166, jan./mar. 2009.

XAVIER, B. B.; LAMMENS, C.; RUHAL, R.; KUMAR-SINGH, S.; BUTAYE, P.; GOOSSENS, H.; MALHOTRA-KUMAR, S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium. **Euro Surveillance**, v. 21, n. 27, p 2016.

WAINWRIGHT, M.; MAISCH, T; NONELL, S.; PLAETZER, K.; ALMEIDA, A.; TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R. Photoantimicrobial-are we afraid of the light? **The Lancet Infectious Diseases**, nov. 2016. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30268-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30268-7)>. Acesso em: 15 jan. 2017.

WINN, W. C.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Koneman Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

WORONZOFF-DASHKOFF, K. K. The wright-giemsa stain Secrets Revealed. **Clinics in Laboratory Medicine**, v.22 n.1, p. 15-23, mar. 2002.