



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

LUCIANA ROSA PIOVESAN ROCHA

**AVALIAÇÃO DA FOTOINATIVAÇÃO MICROBIANA PARA AS BACTÉRIAS
Escherichia coli e *Staphylococcus aureus***

DOURADOS

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AMBIENTAL

LUCIANA ROSA PIOVESAN ROCHA

AVALIAÇÃO DA FOTOINATIVAÇÃO MICROBIANA PARA AS BACTÉRIAS
Escherichia coli e *Staphylococcus aureus*

Dissertação de Mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Ciências e Tecnologia Ambiental, como pré-requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências e Tecnologia Ambiental na área de Ciências Ambientais

Orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima
Caires

DOURADOS
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

R672a

AVALIAÇÃO DA FOTOINATIVAÇÃO MICROBIANA PARA AS BACTÉRIAS *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* / -- Dourados: UFGD, 2016.

80f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Anderson Rodrigues Lima

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Bactéria, resistência, fototerapia, fotossensibilizador, Luz LED.. 2. resistência. 3. fototerapia. 4. fotossensibilizador. 5. Luz LED.. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Avaliação da fotoinativação microbiana para as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*”**, de autoria de **Luciana Rosa Piovesan Rocha**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires
Presidente da banca examinadora (UFMS)

Prof. Dr. Samuel Leite de Oliveira
Membro Examinador (UFMS)

Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 11 de março de 2016.

Dedicatória

*À minha filha, Geovana, razão e
luz de minha vida, amor único e
especial.*

AGRADECIMENTOS

É muito bom passar por uma jornada desta e ter tanto a agradecer, e a tantos querer homenagear. É muito bom dizer obrigado a tanta gente que neste período, em que se é acometido de tantos surtos de tristeza, incertezas, incapacidade, euforia, cansaço e alegrias, conseguiram se manter simplesmente presente.

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado força para vencer essa caminhada enfrentando com coragem e persistência os obstáculos que surgiram e por não me deixar desistir de alcançar meus objetivos.

À minha filha, Geovana, que ainda não sabe ler e compreender as linhas em que escrevo, mas espero que um dia, quando for maior ela possa entender, principalmente as faltas cometidas. A ela dedico esta dissertação por completo, pois talvez tenha sido ela que mais sentiu minha falta em sua elaboração. Nos momentos em que pedia para brincar, passear ou simplesmente para ficar em casa e infelizmente eu não podia, pois algum compromisso me impedia de passar mais tempo em sua presença. Ainda assim, ela foi a minha maior companheira, e é por ela que tive perseverança para terminar este mestrado. Agradeço a minha filha, por todo o amor, pelo carinho, pelas brincadeiras, mas principalmente pelas alegrias em que me proporciona a todo o momento.

Agradeço ao meu esposo Maithon, por todo o carinho, paciência, dedicação, amor e compreensão. Pela participação na realização desta pesquisa, por me incentivar, me apoiar e muitas vezes sanar minhas dúvidas e dificuldades sobre a química e a física. Por estar presente e disposto a ajudar, batalhar e agir, atuando como amigo, companheiro e grande entusiasta. Enfim, sem você, teria se tornado muito mais difícil.

Aos meu pais, Celestino e Ana, que sempre me incentivaram a estudar e sempre priorizar um estudo de qualidade a mim e meus irmãos, ao invés de utilizarem o investimento em outras opções. A todo o carinho, confiança e amor incondicional depositado em mim, mas principalmente ao grande esforço em cuidar da minha pequena para que eu pudesse continuar estudando. Vocês são meu exemplo de dedicação, honra, dignidade e respeito.

Ao meu professor orientador, Anderson Rodrigues Lima Caires, por aceitar esse desafio de orientar uma mestranda trabalhadora, mãe e com área de formação diferente da sua. A você agradeço pela oportunidade, atenção e confiança depositada.

Ao professor Gustavo por ter dado a idéia de utilizar a leitora de microplacas e orientar perante algumas dificuldades nos testes microbiológicos.

Às minhas colegas de trabalho por aguentarem meus momentos de revoltas e cansaço, em especial a Nayara, Christine e a Mayara que enviaram artigos e compartilharam suas experiências com microbiologia ajudando assim na organização dos testes microbiológicos.

Ao HU por me ensinar a erguer a cabeça, agradecer e encarar os obstáculos, que são pequenos comparando com os enfrentados por muitos pacientes que acompanhei e acompanho diariamente.

A todos integrantes do grupo GOA que de uma forma ou outra contribuíram com este trabalho.

À Cynthia que ajudou no processo de extração da clorofila.

Ao Esmael e ao prof. Marcelo que foram o responsável por montar o sistema de iluminação.

Um agradecimento especial à minha amiga e parceira Alessandra, que em tão pouco tempo conquistou todo meu carinho, respeito e admiração e já se tornou uma amiga que quero ter para sempre... Estudamos, rimos, choramos, compartilhamos descobertas e desafios. Obrigada e sempre estarei torcendo pelo seu sucesso.

Enfim, a todos que estiveram presentes neste período gostaria de expressar minha profunda gratidão.

*“Sem sonhos, a vida não tem brilho.
Sem metas, os sonhos não tem alicerce.
Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.
Sonhe, trace metas, estabeleça prioridade e
Corra riscos para executar seus sonhos.
Melhor errar por tentar, do que errar por se omitir!
Não tenha medo dos tropeços da jornada.”*

Augusto Cury

RESUMO

O desenvolvimento de microrganismos patogênicos resistentes a antibióticos vem resultando em um crescente aumento do número de infecções graves e da taxa de mortalidade, provocados pelo uso excessivo e/ou inadequado de medicamentos. Nesse cenário, torna-se necessário desenvolver métodos alternativos que promovam a inativação do crescimento microbiano sem induzir resistência. A fotoinativação microbiana pode ser uma opção promissora no tratamento de infecções microbianas, principalmente superficiais, já que essa técnica dificilmente provocará resistência aos microrganismos devido ao amplo número de alvos que os radicais de oxigênio podem afetar. Basicamente essa técnica envolve a interação da luz em um comprimento de onda adequado, de um fotossensibilizador e de oxigênio molecular para produzir espécies reativas de oxigênio, consequentemente, ocasionando a morte. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade fototóxica do extrato de clorofila, feofitina, eosina azul de metileno e azul de metileno sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* quando irradiada pela luz vermelha (625 nm). A metodologia utilizada para monitorar o crescimento bacteriano foi de diluição seriada utilizando uma leitora de microplacas para realizar e realizando as leituras de absorvância de 15 em 15 minutos durante 24 horas. A irradiação luminosa foi proveniente de um dispositivo de luz LED`s vermelhos com intensidade de 16,25 mW/cm². De acordo com os resultados os fotossensibilizadores analisados possuem propriedades bactericidas, reduzindo o crescimento dos microrganismos. Todavia, o processo de fotoinibição microbiana também foi observado, com melhores resultados para o extrato de clorofila na concentração de 15,60 mg/mL para as duas bactérias e feofitina na mesma concentração somente para a bactéria Gram positiva.

Palavras-chaves: Bactéria, resistência, fototerapia, fotossensibilizador, Luz LED.

ABSTRACT

The development antibiotic resistant pathogens have resulted in an increasing number of severe infections and mortality caused by overuse and / or inappropriate medication. In this scenario, it is necessary to develop alternative methods that promote the inactivation of microbial growth without inducing resistance. Microbial photoinactivation may be a promising option in the treatment of microbial infections, mainly in superficial tissues, since this technique hardly causes resistance to microorganisms due to the large number of targets that oxygen radicals can affect. Basically, this technique involves the interaction of light at a suitable wavelength, a photosensitizer and molecular oxygen to produce reactive oxygen species, thus leading to death. This study aimed to evaluate the phototoxic activity of chlorophyll extract, pheophytin, eosin methylene blue and methylene blue on the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* when irradiated by the red light (625 nm). The used methodology was serial dilution using a microplate reader to perform the absorbance readings every 15 minutes for 24 hours. The light irradiation was from a lighting device with LED's red intensity of 16.25 mW/cm². The results revealed that the four analyzed photosensitizers have bactericidal properties, causing a reduction in the microorganisms growth. However, the microbial process photoinhibition was also noted, with better results for chlorophyll extract at a concentration of 15.60 mg /mL for both bacteria and pheophytin at the same concentration, was only successful for the Gram positive bacterium.

Keywords: Bacterium, resistance, phototherapy, photosensitizer, LED Light.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama simplificado de Jablonski.....	20
Figura 2: Esquema do mecanismo de ação da terapia fotodinâmica.....	21
Figura 3: Estrutura química da molécula de clorofila a e b.....	26
Figura 4: Estrutura química da molécula de feofitina.....	27
Figura 5: Estrutura química da eosina azul de metileno segundo Giemsa.....	29
Figura 6: Estrutura química do azul de metileno.....	29
Figura 7: Esquema da estrutura celular bacteriana.....	30
Figura 8: Morfologia das bactérias.....	31
Figura 9: Coloração de Gram.....	32
Figura 10: Comparação das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	33
Figura 11: <i>Escherichia coli</i>	34
Figura 12: <i>Staphylococcus aureus</i>	36
Figura 13: Representação esquemática simplificada do sistema de irradiação.....	43
Figura 14: Fases do extrato após processo de lavagem.....	44
Figura 15: Diferença da coloração da feofitina em comparação com o extrato.....	45
Figura 16: Representação esquemática da microplaca.....	48
Figura 17: Espectros de absorção dos fotossensibilizadores.....	50
Figura 18: Variação da absorção das amostras controles sem irradiação: Meio de Cultura, Crescimento bacteriano, DMSO e DMSO + HCl.....	52
Figura 19: Comparação do crescimento bacteriano irradiado (IR) e sem irradiação (NIR)	53
Figura 20: Inibição bacteriana do extrato irradiado.....	54
Figura 21: Inibição bacteriana do feofitina irradiado.....	55
Figura 22: Inibição bacteriana do eosina azul de metileno irradiado.....	56
Figura 23: Inibição bacteriana do azul de metileno irradiado.....	57
Figura 24: Comparação do efeito do antibiótico a 1mg/mL dos fotossensibilizadores testados em <i>E. coli</i> , com irradiação.....	58
Figura 25: Comparação do efeito do antibiótico a 1mg/mL dos fotossensibilizadores testados em <i>S. aureus</i> , com irradiação.....	59
Figura 26: Comparação da extrato irradiado (IR) e sem irradiação (NIR) em <i>E. coli</i>	60

Figura 27: Comparação da extrato irradiado (IR) e sem irradiação (NIR) em <i>S. aureus</i>	60
Figura 28: Comparação da feofitina irradiado (IR) e sem irradiação (NIR) em <i>E. coli</i>	61
Figura 29: Comparação da feofitina irradiado (IR) e sem irradiação (NIR) em <i>S. aureus</i>	61
Figura 30: Comparação da eosina azul de metileno irradiado (IR) e sem irradiação (NIR) em <i>E. coli</i>	62
Figura 31: Comparação da eosina azul de metileno irradiado (IR) e sem irradiação (NIR) em <i>S. aureus</i>	63
Figura 32: Comparação do azul de metileno irradiado (IR) e sem irradiação (NIR) em <i>E. coli</i>	63
Figura 33: Comparação do azul de metileno irradiado (IR) e sem irradiação (NIR) em <i>S. aureus</i>	64
Figura 34: Comparação do antibiótico irradiado (IR) e sem irradiação (NIR).....	64
Figura 35: Comparação da inibição da <i>E. coli</i> pelos fotossensibilizadores testados, com ação luz.....	65
Figura 36: Comparação da inibição da <i>S. aureus</i> pelos fotossensibilizadores testados, com ação luz.....	66

LISTA DE SIGLAS, ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

AM - Azul de metileno

AS - Ágar sangue

BHI - Infusão de cérebro e coração do termo: Brain heart infusion

CMH – Caldo Muller Hinton

DMSO - Dimetilsulfóxido

E. coli - *Escherichia coli*

EAM - Eosina azul de metileno

ESBL - Espectro ampliado de beta-lactamase

EXCL - Extrato de clorofila

FEO - Feofitina

FS - Fotossensibilizador do termo: Photosensibilisator

HCl - Ácido clorídrico

HO - Hidroxil

HOMO - Highest occupied molecular orbital

HpD - Hematoporfirinas

HpIX - Protoporfirina IX

H₂O₂ - Peróxido de oxigênio

IR - Irradiado

Kcal - Quilocalorias

Kg - Quilogramas

L - Litro

LED - Diódo emissor de luz por emissão esimulada de radiação do termo: Light amplificador
by stimulated emission of radiation

LPS - Lipopolissacarídeo

LUMO - Lowest unoccupied molecular orbital

MH - Ágar muller hinton

min. - Minutos

mg - Miligramas

Mg²⁺ - Magnésio

mL - Mililitro

mm/Hg - Milímetros de mercúrio

mW - Miliwatts

mol - Unidade de base do Sistema Internacional de Unidades (SI) para a grandeza quantidade de matéria

NaCl - Cloreto de sódio

NIR - Não Irradiado

nm - Nanômetros

TFD - Terapia Fotodinâmica do termo: Photodynamic Therapy

TFDA - Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

pH - Potencial de Hidrogenio

pKa – Log da constante de acidez

ROS - Espécie reativa de oxigênio

rpm - Rotação por minuto

S. aureus - *Staphylococcus aureus*

s - Segundos

SE - Erro padrão

Shaker - Incubadora com agitação

SB – Suspensão bacteriana

UFC - Unidade formadora de colônias

UV – Ultravioleta

VISA - Vancomycin Intermediate *S. aureus*

β - Beta

μL - Microlitros

μg - Microgramas

μm - Micrômetro

π - pi

°C - Graus Celsius

O₂ - Oxigênio

³O₂ - Estado fundamental triplete

¹O₂ - Primeiro estado excitado

¹O*₂ - Segundo estado excitado

% - Porcentagem

SUMÁRIO

RESUMO.....	06
ABSTRACT.....	07
LISTA DE FIGURAS.....	08
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 Terapia fotodinâmica.....	17
3.1.1 Histórico.....	17
3.1.2 Conceito.....	18
3.1.3 Mecanismo de ação.....	18
3.1.4 Fonte de luz.....	21
3.1.5 Fotossensibilizadores.....	22
3.1.5.1 Clorofila e feofitina.....	24
3.1.5.2 Eosina azul de metileno.....	27
3.1.5.3 Azul de metileno.....	28
3.2 Bactérias.....	29
3.2.1 <i>Escherichia coli</i>	33
3.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	34
3.2.3 Resistência a antibióticos.....	36
3.2.4 Fotoinativação microbiana.....	37
3.2.4.1 Resistência a inativação fotodinâmica.....	38
3.2.4.2 Pesquisas da Inativação microbiana através da TFD.....	39
4 METODOLOGIA.....	41
4.1 Materiais.....	41
4.1.1 Reagentes.....	41
4.1.2 Equipamentos.....	41
4.1.3 Sistema de LED`s.....	41
4.2 Procedimentos	42

4.2.1 Material vegetal.....	42
4.2.2 Preparo do extrato.....	43
4.2.3 Obtenção da feofitina.....	44
4.2.4 Corantes.....	44
4.2.5 Antibiótico.....	45
4.2.6 Teste microbiológico.....	45
4.2.6.1 Cepas microbianas.....	45
4.2.6.2 Preparo das suspensões bacterianas.....	45
4.2.6.3 Determinação da inibição bacteriana.....	46
4.2.6.4 Leitura da microplaca.....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 Absorção dos fotossensibilizadores.....	49
5.2 Controles.....	50
5.3 Avaliação da terapia fotodinâmica.....	52
5.4 Terapia fotodinâmica X Antibiótico.....	57
5.5 TFD X Efeito do fotossensibilizador.....	58
5.6 Comparação dos fotossensibilizadores.....	64
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

Apesar do avanço obtido no tratamento de infecções, é preocupante o aumento da incidência de bactérias patogênicas resistentes à antimicrobianos, no mundo, nas últimas décadas (SANTOS; MENEZES; OLIVEIRA, 2009). As bactérias multiplicam-se rapidamente e um microrganismo mutante capaz de sobreviver na presença de um antibiótico se tornará predominante na população microbiana. Dessa forma, mostra-se importante o desenvolvimento de novas técnicas de inativação do crescimento microbiano sem ativar os mecanismos de resistência (PERUSSI, 2007).

A fotoinativação de microrganismos é uma área de estudo em expansão que envolve a interação de um fotossensibilizador, de uma luz de comprimento de onda adequado e do oxigênio molecular. Durante este evento são produzidas espécies reativas do oxigênio (EROs) que inviabilizam componentes biológicos presentes no meio, promovendo a inibição ou a morte de microrganismos (DEMINOVA; HAMBLIN, 2005).

A fototerapia pode ser usada contra vírus, bactérias e fungos, como uma terapia alternativa para infecções localizadas. Diferentemente da terapia fotodinâmica (TFD) utilizada para o tratamento de câncer, onde o fotossensibilizador (FS) é injetado na corrente sanguínea e se acumula nas células cancerígenas, a fotoinativação microbiana (TFDA) pode ser realizada por aplicação local do FS na área infectada através de aplicação tópica, instilação, injeção intersticial ou aerossol (HAMBLIN, 2004).

As bactérias Gram-positivas geralmente são mais susceptíveis à fototerapia quando comparado com as bactérias Gram-negativas. Esta diferença é atribuída devido às diferenças estruturais da parede celular, ou seja, as bactérias Gram-negativas têm uma membrana externa com uma estrutura complexa composta por bicamadas lipídicas enquanto as bactérias Gram-positivas possuem uma bicamada única e uma camada externa permeável (DEMINOVA; HAMBLIN, 2005).

A fotoinativação é considerada um método alternativo por permitir a eliminação de microrganismos de regiões infectadas ou de locais que possam veicular e disseminar microrganismo resistentes à antibioticoterapia. No entanto, a morte celular microbiana é dependente da concentração utilizada do FS, do tempo e intensidade de irradiação (REACHER et al., 2000).

A vantagem da fototerapia contra microrganismos é que o efeito é rápido, altamente localizado e não interfere na microflora de outros sítios do corpo. Como a citotoxicidade é

dependente da produção de oxigênio singlete e radicais livres, a resistência ao procedimento é bem pouco provável (HAMBLIN, 2004).

Na presente proposta, FS baseados em moléculas porfirínicas, Extrato de clorofila (EXCL) e feofitina (FEO) e os corantes comerciais eosina azul de metileno (EAM) e azul de metileno (AM) serão aplicados para avaliar o potencial como inativantes fotodinâmicos das bactérias, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica facultativa que assume a forma de um bacilo e pertence à família das *Enterobacteriaceae*, a maioria pertencente à microbiota intestinal (VAZQUEZ et al., 2003). É o microrganismo mais frequente isolados no meio, sendo também o mais proeminente agente etiológico das infecções urinárias, das septicemias e das meningites bacterianas nos neonatos (VAZQUEZ et al., 2003; REACHER et al., 2000; FOXMAN, 2002; KAHLMETER, 2003). Alguns estudos apontam-na como uma das bactérias mais isoladas nas infecções cirúrgicas (BROOK; FRAZIER, 1999). O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva em forma de esféra (coccus), microscopicamente aparece aos pares, em cadeias curtas ou em cachos similares aos da uva ou em grupos (BENENSON, 1995). A bactéria *Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes de infecções nosocomiais e principal causador de infecção cirúrgica em todo o mundo (TAKAHASHI; TANAKA; ASHIKI, 1990). Estes microrganismos estão presentes na pele humana, narinas e mucosas como um patógeno oportunista capaz de infectar, invadir, persistir e se replicar em muitos tecidos humanos (BAE et al., 2004; MURRAY et al., 2006).

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a susceptibilidade da *Escherichia coli* e da *Staphylococcus aureus* ao processo de TFD quando irradiado pela luz vermelha e utilizando EXCL, feofitina, EAM e AM como FS.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a inativação do crescimento da *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, utilizando o EXCL, FEO, EAM e AM em condições de ausência de luminosidade;
- Averiguar o efeito fototóxico dos FS (EXCL, FEO, EAM e AM) sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* quando submetida à irradiação em luz vermelha (625nm);
- Verificar o efeito da fotoinativação da *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* quando submetida à diferentes concentrações dos FS (EXCL, FEO, EAM e AM);
- Avaliar a viabilidade de leitura de microplas para monitorar a inibição do crescimento bacteriano após a irradiação;
- Verificar a ação do antibiótico vancomicina e análise comparativa deste efeito com os FS utilizados neste estudo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Terapia fotodinâmica

3.1.1 Histórico

A utilização da luz como agente terapêutico começou a ser relatada há mais de 4000 anos, quando os egípcios, indianos e chineses descobriram que algumas doenças de pele podiam ser tratadas com plantas e com o auxílio da ação da luz solar, assim como o vitiligo e psoríase (ACKROYD et al., 2001). No entanto, somente em 1900 surgiu o primeiro relato da TFD, com os experimentos de Raab, no qual descreveu a ação letal do corante vermelho de acridina associado à luz, durante uma tempestade com raios em um tipo de protozoário. Ele postulou que as alterações das condições luminosas do ambiente afetam a transferência da energia da luz para a substância química, semelhante ao que ocorre nas plantas no processo de fotossíntese (RYSKOVA et al., 2010).

Alguns anos depois, Von Trappeiner e Jesionek realizaram a aplicação tópica do corante eosina com exposição à luz branca para o tratamento de um câncer de pele (VON TAPPEINER; JESIONEK, 1903).

Na década de 1960, após estudos obtidos a respeito do acúmulo preferencial de corantes em tumores terem apresentado resultados promissores, Lipson, sob orientação de Schwartz investigou o acúmulo de um derivado de hematoporfirinas em uma portadora de câncer de mama, observando que a incidência de luz proporcionava a regressão da doença. Esse fato marcou o início da TFD para o tratamento clínico do câncer (MACHADO, 2000; SIMPLÍCIO et al., 2002; PRATES, 2005). A partir de então, os estudos progrediram e a metodologia empregada foi aprovada para tratamento de alguns tipos de câncer (PRATES, 2005; FERRO et al., 2007).

Apesar destas descobertas, a ação fotodinâmica aplicada no campo de doenças infecciosas não foi explorado por várias décadas devido principalmente a descoberta dos antibióticos em 1940 que fez com que os cientistas acreditassem que as doenças de origem bacteriana pudessem ser gradualmente reduzidas (JORI et al., 2006). Porém nos últimos anos

têm havido o rápido aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos, divergindo das expectativas da comunidade científica.

Somente em 1990 com a disseminação da AIDS e o crescimento das infecções hospitalares causadas pela multiplicação das bactérias resistentes aos fármacos que começou a utilizar a fototerapia como uma opção no tratamento de infecções (JORI et al., 2006; FERRO et al., 2007; DAI et al., 2009; RYSKOVA et al., 2010).

3.1.2 Conceito

A TFD é uma tecnologia de saúde minimamente invasiva, utilizada no tratamento de doenças malignas e não malignas, assim como para a inativação de vírus, bactérias e fungos. Consiste na administração tópica ou sistêmica de fotossensibilizador (FS) seguida de irradiação com luz visível de comprimento de onda compatível com o espectro de absorção do FS. Portanto, o FS e a luz na presença de oxigênio molecular geram espécies citotóxicas letais capazes de danificar componentes celulares como membranas, proteínas e ácidos nucleicos, provocando a destruição irreversível destes e possibilitando grande seletividade, pois somente as células que são expostas simultaneamente ao FS e luz sofrerão o efeito fototóxico (SHARMAN et al., 1999; STARK, 2005).

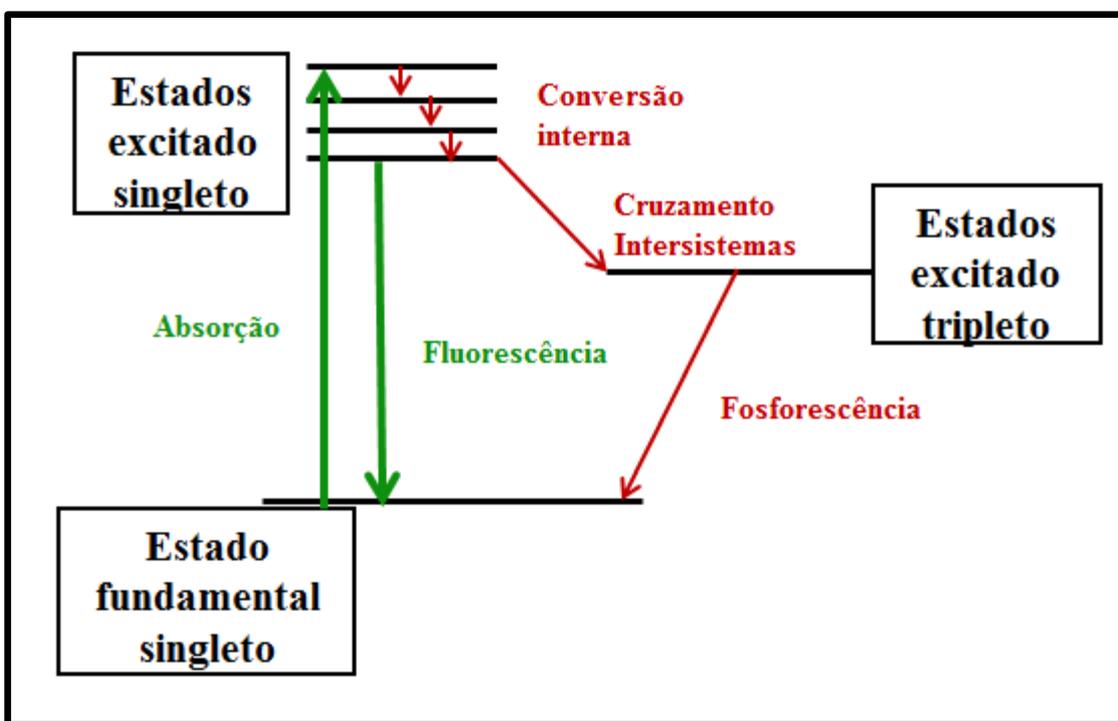
3.1.3 Mecanismo de ação

A TDF envolve três componentes básicos: a luz, um FS e o oxigênio molecular. Estes elementos combinados produzem potentes espécies oxidantes (DENIS, 2011a). Quando um FS sofre radiação com luz de comprimento de onda específico, passa por uma transição de um estado fundamental de baixa energia para um estado singleto excitado, estado este de curta duração. Isto é alcançado, pois no estado fundamental um FS está no estado singleto onde todos os seus elétrons estão com spins emparelhados em orbitais de baixa energia (RAJESH, 2012). Após a aplicação da luz correspondente ao pico de absorção do FS o elétron ocupando o mais alto orbital molecular HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) do FS é excitado

para o mais baixo orbital molecular desocupado LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) chegando ao estado singleto excitado, o estado de interesse (DENIS, 2011a).

Subsequentemente, o FS pode decair de volta ao seu estado fundamental com a emissão de fluorescência ou pode sofrer uma transição para um estado de tripleto de energia mais elevada. O estado tripleto pode reagir com biomoléculas para produzir o oxigênio singleto e outras espécies de radicais, causando uma destruição rápida e seletiva no tecido alvo (RAJESH, 2012). Os processos descritos acima podem ser ilustrados pelo diagrama simplificado de Jablonski (Fig. 1).

Figura 1: Diagrama simplificado de Jablonski



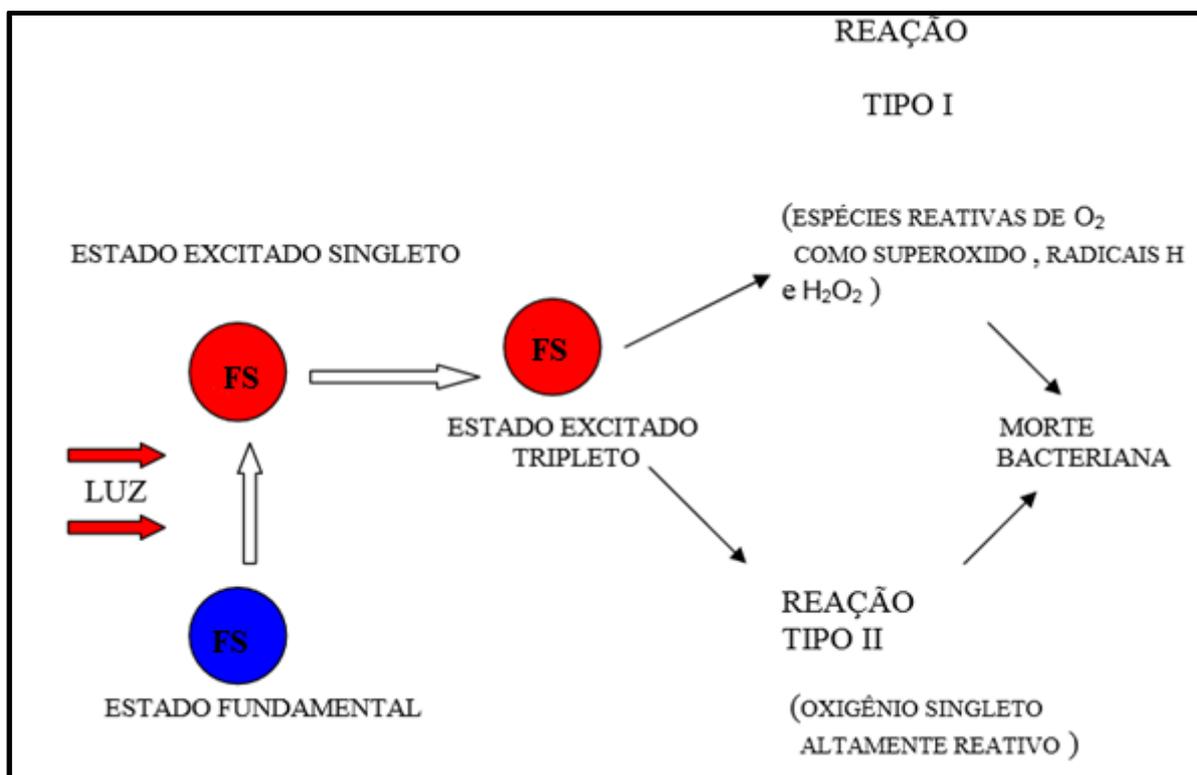
Fonte: Adaptada de MOORE et al., 1976

A reação com biomoléculas pode ser por duas vias: tipo I e tipo II (Fig. 2). A reação do tipo I envolve transferência eletrônica do FS excitado ao substrato orgânico, por reações de oxido-redução com biomoléculas, criando produtos radicais livres que são altamente reativos (BIEL, 2011) e interagindo com oxigênio molecular produzindo as espécies, como superóxido, hidroxila e peróxido de hidrogênio (RAJESH, 2012).

Já a do tipo II é uma reação de troca de energia entre o FS no estado tripleto e o oxigênio molecular, produzindo oxigênio singleto, um estado altamente reativo que por si só

causa reações em cadeia com componentes da célula, tais como DNA, proteínas, fosfolipídios da membrana celular, etc., causando então a morte celular (BIEL, 2011).

Figura 2: Esquema do mecanismo de ação da terapia fotodinâmica



Fonte: Adaptada de RAGHAVENDRA et al Australian Dental Journal 2009

A molécula de oxigênio no estado singlete pode perder sua energia por emissão de fótons ou cruzamento intersistemas e voltar para seu estado fundamental sem começar qualquer reação (GILBERT; BAGGOTT, 1991). Portanto, a eficácia da fototerapia aumenta quando o rendimento quântico de conversão e o tempo de vida do estado tripleto do FS aumentam, bem como com o tempo de vida do estado singlete do oxigênio (GROSSWEINER, 1999).

Para aumentar a eficiência do processo também pode ser aumentada a velocidade de reação do oxigênio singlete com certos reagentes, tais como DNA, proteínas ou membranas celulares. Isto acontece quando o oxigênio singlete é gerado perto deste reagente, o que significa aumentar a probabilidade de encontro entre este reagente e oxigênio singlete. Outro caminho para aumentar a eficiência do processo fotodinâmico é aumentar a afinidade do sensibilizador com as estruturas que devem ser destruídas (HAYEK et al; 2004).

3.1.4 Fonte de Luz

A TFD necessita uma fonte de luz que ative o FS através da exposição à luz, em um comprimento de onda específico. Esta luz tem que excitar o FS para transferir energia e/ou carga para a reação fotodinâmica ser desencadeada. A janela da TFD desejada é no comprimento de onda entre 600 e 900 nm, pois os tecidos humanos transmitem eficientemente luz vermelha, e ativação do FS resulta na penetração da luz em locais mais profundos (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007).

O sucesso da TFD depende de alguns fatores como: comprimento de onda, o tempo de aplicação da luz no sitio alvo, a intensidade da luz, e o intervalo de tempo entre a administração do FS e a irradiação (GEROLA, 2010).

As primeiras fontes de luz a serem utilizadas foram lâmpadas convencionais com a luz não-coerente, policromática e com um forte componente térmico associado e assim era difícil calcular a sua dosimetria (ACKROYD et al., 2001; AMARAL et al., 2010). Outras fontes de luz com filtros específicos que permitiam escolher o comprimento de onda de maior penetração nos tecidos e a absorção máxima do FS foram utilizadas, como: luz pulsada, luz não coerente (projektor de slides), lâmpada de xenônio, entre outras. No entanto essas fontes de luz deixaram de ser utilizadas com a descoberta e desenvolvimento dos lasers (ACKROYD et al., 2001).

Os lasers possuem características importantes como: monocromaticidade por ser composta por apenas um único comprimento de onda; intensidade alta; caráter unidirecional, já que o feixe de luz é composto por fótons que propagam na mesma direção; e coerência pelas ondas que se mantêm sincronizadas (FELDMAN, 2009). Além disso, Ackroyd et al., 2001 reportam que é fácil de calcular a dose da luz laser e esta pode ser transmitida por uma fibra óptica até o local do tratamento.

A mais recente fonte de luz utilizadas são os LEDs (Light Emmitting Diodes- diodos emissores de luz), que consiste em luz monocromática que apresenta um baixo componente térmico, com banda estreita de comprimento de onda. No entanto, o LED possui mecanismo espontâneo de geração da radiação com pouca energia para geração de luz, apresentando largo espectro de luz não coerente e com maior divergência (AMARAL et al., 2010).

Apesar das fontes de LED apresentarem potência muito inferior ao laser, acabam sendo vantajosas por serem mais econômicas, pequenas, leves e altamente flexíveis (SOARES, 2006). Assim, os sistemas de LED podem ser confeccionados em diferentes

formatos e tamanhos, tem baixo custo e baixo nível de dano celular (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007). O laser e o LED produzem irradiação em comprimento de onda específico, no entanto o LED emite irradiação numa faixa mais ampla do espectro e não é coerente e colimada, como a irradiação laser (SOARES, 2006).

3.1.5 Fotossensibilizadores

Os FS são divididos em três gerações: a primeira são derivados de hematoporfirinas (HpD), na segunda têm-se compostos com absorção em comprimentos de onda na região do vermelho do espectro eletromagnético, como as ftalocianinas, clorinas, bacterioclorinas; enquanto a terceira geração abrange FS da segunda geração modificados (Lutex, Foscan, etc.) (ALLISON et al., 2004).

Os FS precisam apresentar propriedades químicas, farmacológicas e fotobiológicas específicas que o qualificam como um bom agente para a terapia, isto é, ter baixa toxicidade no escuro; rápido acúmulo no tecido doente sem apresentação de fotossensibilidade prolongada; formulação simples, reproduzível e alta estabilidade biológica; propriedades farmacocinéticas favoráveis, com rápida eliminação pelo corpo; facilidade de manuseio sintético e obtenção a custos reduzidos; além de alta afinidade e seletividade. (SOARES, 2006; AMARAL et al., 2010). Além disso, é preciso ser obtido facilmente em escala industrial, com bom custo-benefício, e ter facilidade de armazenamento (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007).

Os FS também devem possuir propriedades fotofísicas adequadas como: alto coeficiente de absorção molar em comprimentos de onda maiores que 650 nm do espectro eletromagnético, faixa conhecida como janela terapêutica, na qual se tem menor absorção de luz pelos tecidos biológicos; alto rendimento quântico no estado tripleto para assim ativar grandes concentrações do FS; alto rendimento quântico na geração de oxigênio singleto; afinidade de ligação com os microrganismos; um amplo espectro de ação; baixa afinidade com células humanas para evitar o risco de fotodestruição dos tecidos do hospedeiro; e baixo rendimento de reação de fotobranqueamento do FS, causando a diminuição da concentração da molécula fotoativa e assim comprometendo os processos envolvidos na oxidação de biomoléculas (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002; SOUKOS; GOODSON, 2011).

Alguns estudos físico-químicos de fármacos FS e seus efeitos em TFD nos sistemas *in vivo* e *in vitro*, têm mostrado que a fotoatividade da maioria desses compostos é dependente de fatores relacionados à associação preferencial com as membranas biológicas, estado de agregação, difusão, seletividade, que são influenciados por solvente, eletrólitos, temperatura, micelas, pH, etc (GEROLA, 2010).

A importância da absorção do medicamento pelo organismo e a seletividade deve-se ao fato de que a alta eficiência na entrega seletiva diminui os efeitos colaterais, permitindo ainda uso de doses menores de composto ativo mantendo-se a eficácia (GEROLA, 2013).

O grau de hidrofobicidade de fármacos utilizados em TFD está diretamente relacionado com a seletividade e afinidade com os tecidos doentes. Os FS com caráter hidrofóbico se acumulam preferencialmente em células com neoplasia; em decorrência da agregação do FS a lipoproteínas do plasma e, conseqüentemente, células tumorais possuem inúmeros receptores de lipoproteínas de baixa densidade, devido à grande demanda por colesterol. A localização e associação preferencial dos FS com as membranas biológicas, nas quais os lipídios e as proteínas, são os principais alvos da destruição fotoinduzida, são de importância fundamental para o sucesso da TFD. A alta hidrofobicidade é uma característica favorável, já que auxilia na incorporação dos FS às membranas biológicas, mas, por outro lado, é responsável pelo processo indesejável da TFD que é a autoagregação em meio aquoso. A autoagregação leva a menor solubilidade do fármaco, diminuição do tempo de vida de seu estado tripleto e, conseqüentemente, redução do rendimento na geração de oxigênio singlete (JORI, 1996; GEROLA, 2013).

Adicionalmente, a variação de pH em alguns tecidos influencia o grau de protonação dos FS que possuem grupos ácido-base e dessa maneira determina a espécie predominante em um determinado ambiente. Esse processo afeta propriedades importantes, tais como solubilidade, lipofilicidade, estabilidade da formulação, transporte passivo e autoagregação. Uma vez que a espécie do FS predominante no meio controla a carga das mesmas, espécies carregadas favorecem a sua solvatação e as mantém afastadas entre si, inclusive por repulsão de carga, enquanto as espécies neutras são mais suscetíveis à autoagregação formando dímeros, trímeros e outros agregados. Acrescente-se à relevância da determinação do pKa do FS o fato de que tecidos tumorais possuem pH inferiores aos sadios. Além disso, nas superfícies de membranas e sistemas coloidais como micelas e lipossomas tem-se uma acentuada variação de pH local (ao redor de 1 a 2 unidades) (WATERBEEMD, 2004; BONNEAU et al., 2004; CUNDERLIKOVA, GANGESKAR, MOAN, 1999; PREVIDELLO et al., 2006).

A tarefa de direcionar o princípio ativo à região alvo de maneira eficiente e rápida, apresentando maior solubilização, prevenção da agregação, manutenção de suas propriedades fotofísicas e para que possam ser adequadamente absorvidas e incorporadas pelos sistemas celulares com menor toxicidade e efeitos colaterais, pode ser efetuada por sistemas carregadores de fármacos, geralmente constituídos por sistemas coloidais aquosos, tais como lipossomos, micelas, ciclodextrinas, etc. (MALMSTEN, 2002).

Os FS utilizados nesta pesquisa foram EXCL, feofitina, EAM e AM. Portanto, nos próximos itens discutiremos sobre cada um destes.

3.1.6.1 Clorofila e feofitina

A descoberta de que a clorofila pode ser utilizada como FS na TFD ocorreu no ano de 1987 pelo Departamento de Microbiologia da Universidade de Yonsei e pelo Departamento de Química da Universidade de Ajou (PARK et al., 1989; LEE et al. 1990). A clorofila é o pigmento mais abundante e amplamente distribuído na maioria das plantas (LEE et al., 1990). Além disso, a clorofila pode ser facilmente metabolizado pelo corpo humano após a ingestão de alimentos com sua presença (LI et al., 2007).

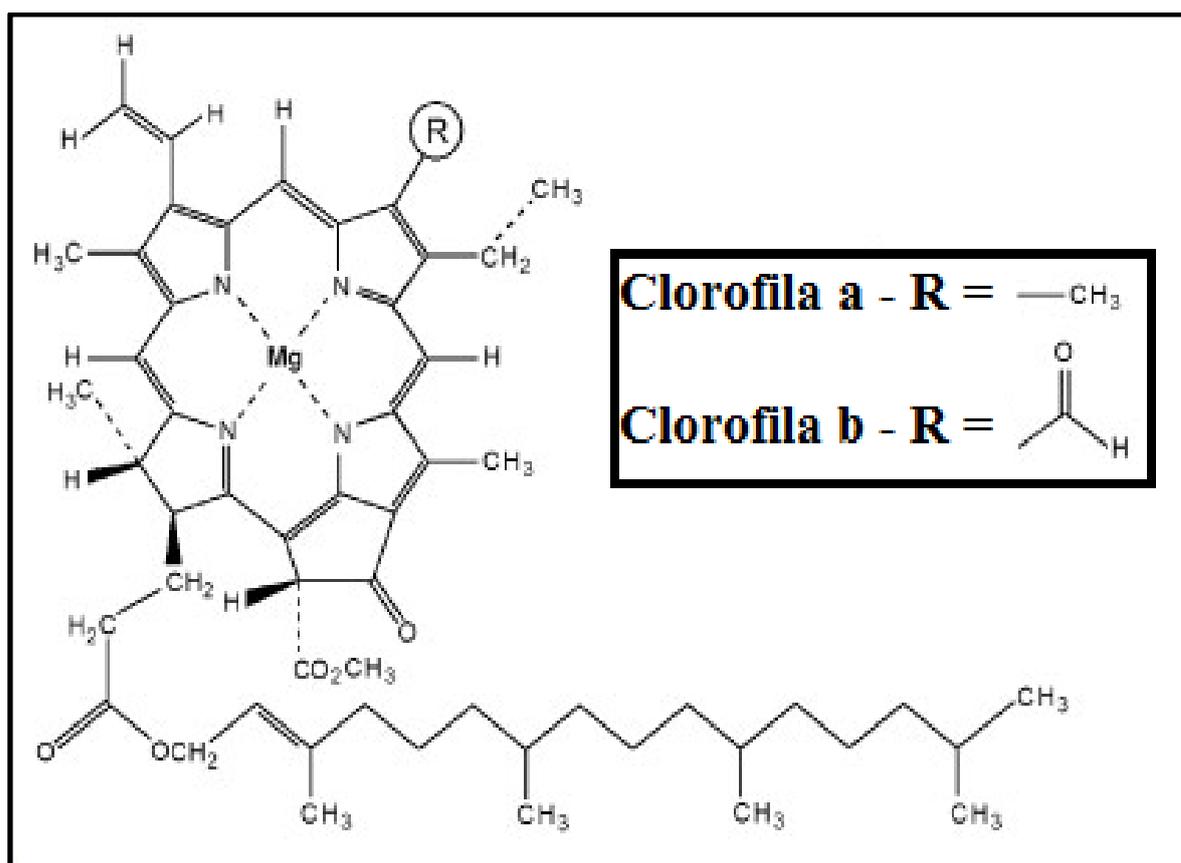
A clorofila é um composto da classe das clorinas e com estrutura molecular composta por um anel porfirínico com um dos anéis pirrólicos reduzido e com um íon magnésio central ligado aos nitrogênios, além de uma cadeia fitílica longa e apolar responsável pela alta hidrofobicidade da molécula. Essa cadeia fitílica também é importante na agregação e/ou interação com ambientes hidrofóbicos (AGOSTIANO et al., 2000; FIEDOR et al., 2003), enquanto o tipo de metal complexado ao anel porfirínico afeta propriedades fotofísicas e a sua estabilidade, além de favorecer a formação de interações com sítios específicos. Assim a clorofila apresenta características hidrofóbicas devido à ausência de carga e a presença de um grupo fitol (LIMANTARA et al., 2006).

A clorofila é o pigmento fundamental no processo de fotossíntese, pois juntamente com pigmentos acessórios (carotenóides, bacterioclorofilas e xantofilas) captura energia luminosa. A radiação capturada é convertida em energia química e armazenada como carboidratos e outros constituintes dos tecidos vegetais, liberando oxigênio como resíduo. Na natureza, existem aproximadamente 10 tipos de clorofilas que foram isoladas de plantas. Existem organismos que possuem somente clorofila, mas na maioria a clorofila é

acompanhada por pigmentos auxiliares. Dentro da classe das clorofilas têm-se as clorofilas *a*, *b*, *c* e *d*, e bacterioclorofilas *a* e *b*. As clorofilas *a* e *b* diferem entre si somente pelos substituintes do carbono C-3, ou seja na clorofila *a* tem-se um grupo metil e na clorofila *b* um grupo aldeído. As *c* e *d* são observadas em algas que possuem também clorofila *a* (GEROLA, 2010). O componente verde mais abundante é a clorofila *a*, seguido pelas clorofilas *b*, *c* (*c1* e *c2*), *d* e protoclorofila. As bactérias fotossintéticas são compostas por bacterioclorofilas (SOARES, 2006).

As clorofilas mais utilizadas para pesquisas são as clorofilas *a* e *b* (Fig. 3) e estas podem ser transformada em diferentes derivados que exibem uma estrutura molecular básica de compostos de clorina (LI et al., 2007).

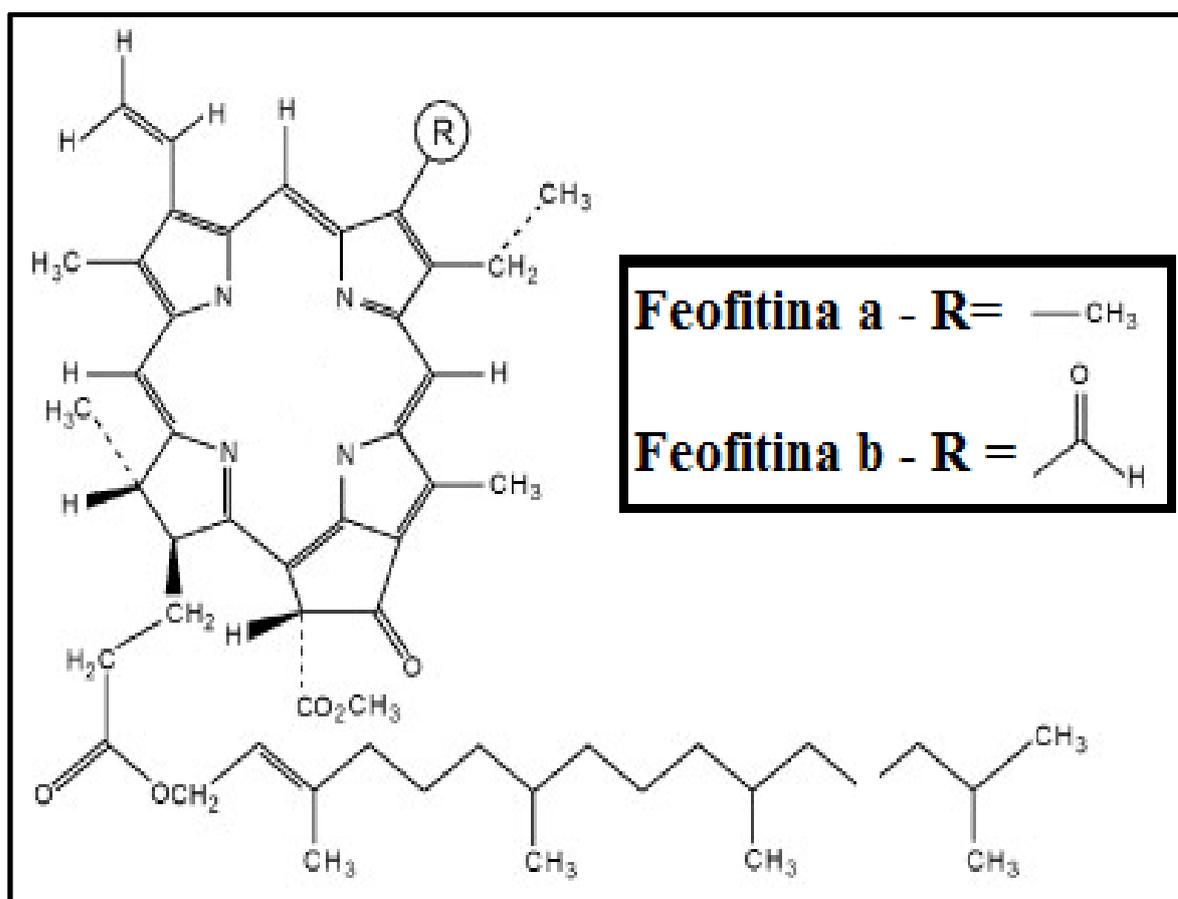
Figura 3: Estrutura química da molécula de clorofila a e b



Fonte: Adaptado de LANFER-MARQUEZ, 2003

A feofitina é obtida pela substituição do íon Mg^{2+} da molécula de clorofila por dois átomos de hidrogênio através de hidrólise ácida (Fig. 4).

Figura 4: Estrutura química da molécula de feofitina



Fonte: Adaptado de GEROLA, 2010

As clorofilas e seus derivados apresentam características adequadas para serem usadas na TFD contra vários tipos de câncer (LI et al., 2007), mas poucas pesquisas têm sido realizadas para testar a capacidade da clorofila ser um FS para a ser utilizada na TFD (GEROLA et al., 2011a).

O espectro de absorção da clorofila demonstra alta absorção de luz no visível, e longo tempo de vida do estado excitado, que implica em um alto rendimento quântico de oxigênio singlete. Essas características são extremamente favoráveis e adequadas para a clorofila ser utilizada como FS em TFD (SOARES, 2006; GEROLA et al., 2011a). Portanto, o caráter hidrofóbico das clorofilas responsáveis pela autoagregação em meio aquoso pode ser um fator limitante de sua aplicação na técnica (GEROLA, 2010).

A clorofila e feofitina utilizadas nesta pesquisa foram extraídas da *Cichorium intybus*, conhecida popularmente como chicória selvagem, chicória do mato, rúcula selvagem, rúcula do mato, entre outros.

O *Cichorium intybus* pertence ao Gênero *Artemisia*, da Família *Asteraceae* (*Compositae*). É uma das maiores famílias de plantas florescentes no mundo e de grande importância do ponto de vista econômico devido as plantas comestíveis e ornamentais. Entre as comestíveis estão a alcachofra (*Cynara scolymus*), o almeirão ou chicória (*Cichorium intybus*) e o girassol (*Heliantus annuus*), e entre as espécies ornamentais os *Senecio*, *Aster*, *Zinnia*, *Dahlia*, *Ageratum*, *Chrysanthemum*, *Gerbera*, *Tagetes*, *Calendula* (SIMPSON et al, 2009, LORENZI; MATOS, 2002).

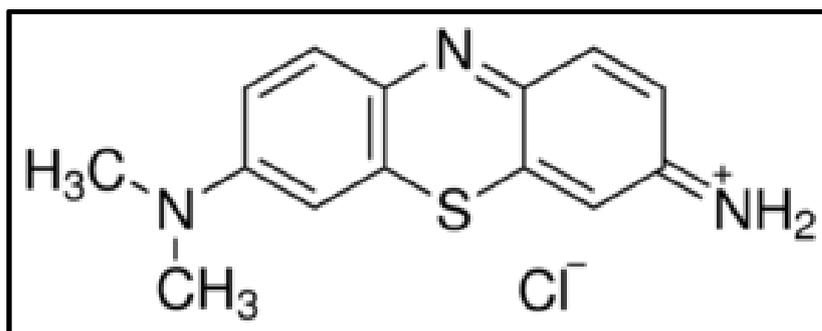
O gênero *Artemisia* é conhecido pela sua produção de compostos aromáticos, portanto, a investigação tem-se centrado na composição química dos metabólitos voláteis secundários obtidos a partir de várias espécies de *Artemisia*. Apresentaram atividade inseticida, atividade inibidora da alimentação de insetos, e repelente das espécies *Sitophilus granarius L.*, *S. oryzae*, *S. zeamais*, *Aedes aegypti*, *Callosobruchus maculatus*, *Spodoptera ittoralis* e *Tribolium castanedum*; bactericida; efeito helminticida e acaricida contra *Tetranychus cinnabarinus*; antimaláricas (SOARES, 2012)

3.1.6.2 Eosina azul de metileno

Romanowsky idealizou um método em que uma solução de corantes poderia corar diferentes estruturas. A mistura dos corantes eosina e AM são preparadas segundo proposição de Leishman, May-Grunwald, Giemsa, Wright e outros. Estes corantes são dissolvidos em álcool, no entanto o AM se oxida em gradações diferentes, originando diversos “azures” de metileno. Teremos então uma solução alcoólica de um complexo eosinato de azul e “azures” de metileno (OLIVEIRA et al, 2015).

A EAM, segundo Giemsa (Fig. 5) é utilizada para a coloração de exames hematológicos e histológicos. Este é uma mistura de azur II (mistura equimolar do azur 1 e AM) e eosinário de azur II (Mistura equimolar de azur 1, AM e eosina amarela) (ROSMAN, 2012).

Figura 5: Estrutura química da eosina azul de metileno segundo Giemsa



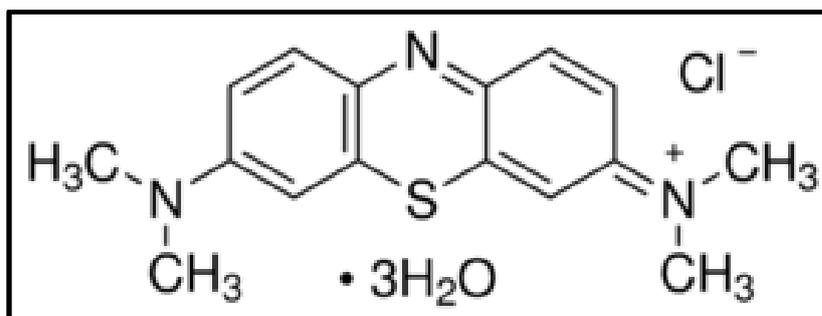
Fonte: Sigma- Aldrich®

3.1.6.3 Azul de metileno

O AM foi a primeira droga totalmente sintética utilizada na medicina. Em 1891, Paul Guttman e Paul Ehrlich a utilizaram para o tratamento da malária (SCHIRMER et al., 2011). O AM também é utilizado na coloração e caracterização células sanguíneas e parasitas da malária pela colocação Giemsa; na identificação de *Mycobacterium tuberculosis* (BARCIA, 2007; FLEISCHER, 2004; GARCIA-LOPEZ et al., 2007); em medicamentos psicotrópicos e antidepressivos (HARVEY et al., 2010).

O AM (Fig. 6) é um derivado de fenitiazina que possui estrutura tricíclica (WAINWRIGHT, 2005). O AM apresenta características favoráveis para uso em TFD, como intensa absorção na região de 600 - 700 nm, considerável rendimento quântico, baixa toxicidade e baixo custo (HARRIS et al., 2004; WAINWRIGHT, 2007).

Figura 6: Estrutura química do azul de metileno



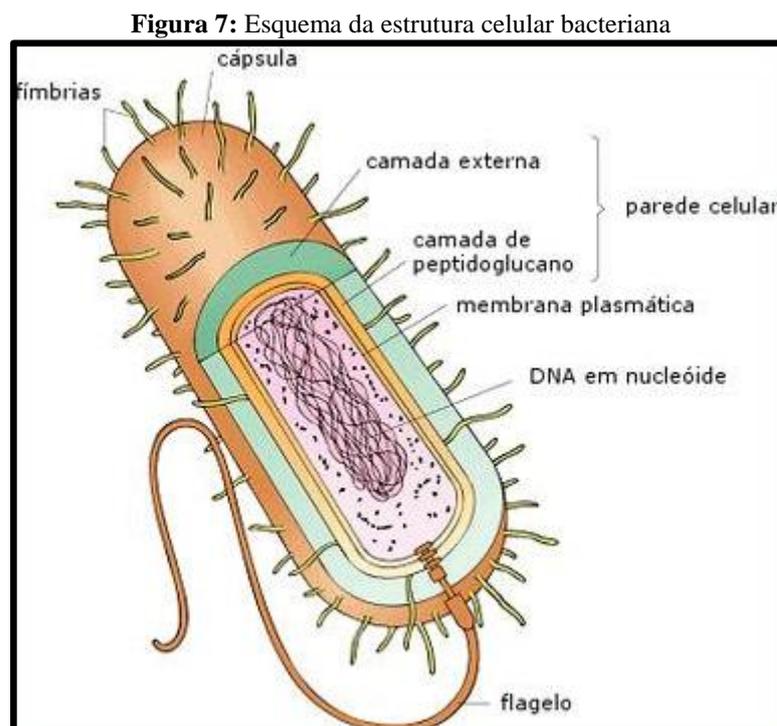
Fonte: SOARES, 2006

Atualmente o AM é indicado para metemoglobinemia hereditária enzimopênica, metemoglobinemia aguda adquirida, prevenção de infecções do trato urinário em doentes idosos, visualização de nervos intra-operatório, tecidos nervosos, glândulas endócrinas entre outros (SCHIRMER et al., 2011).

3.2 Bactérias

As bactérias (Fig. 7) são seres relativamente simples, unicelulares e procariontes, ou seja, não apresentam um núcleo organizado, portanto seu material genético (DNA) encontra-se disperso pelo citoplasma, que é delimitado pela membrana celular e uma parede celular (JORGE, 2012a).

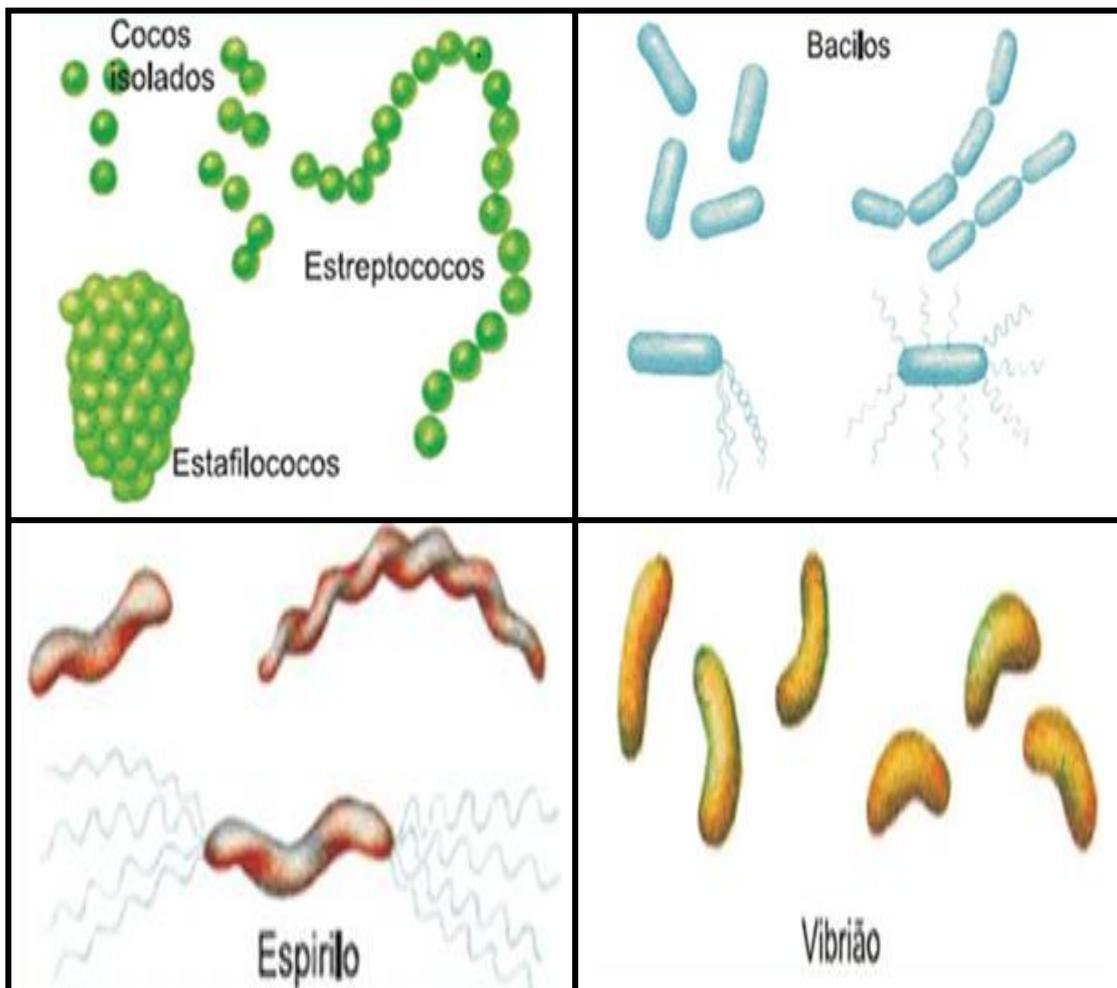
Reproduzem-se pela divisão de uma célula em duas células idênticas, denominada de fissão binária. Para a sua nutrição muitas bactérias utilizam compostos orgânicos encontrados na natureza a partir de organismos vivos ou mortos. Algumas sintetizam seu próprio alimento por fotossíntese, enquanto outras obtêm seu alimento a partir de substâncias inorgânicas (TOTORA et al, 2010).



Fonte: Adaptado de JORGE, 2012a

Morfológicamente podem ser encontrados sob a forma de coco, bacilos, vibriões e espirilo. Os cocos podem se agrupar e formar: pares (diplococos), enfileirados (estreptococos) e cachos (estafilococos), conforme pode ser verificado na Figura 8 (JORGE, 2012a).

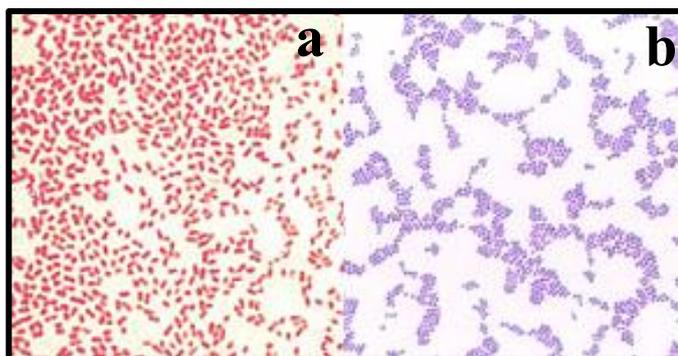
Figura 8: Morfologia das bactérias



Fonte: Adaptado de SILVA, 2013.

A parede celular é um componente vital ao desenvolvimento e sobrevivência das bactérias tendo como função a manutenção da pressão osmótica, controle de forma celular e mediação de adesão à superfície de outras células. Então de acordo com a constituição da parede celular, Christian Gram desenvolveu um método de coloração em 1884, chamado de Coloração Gram (Fig. 9) que acabou dividindo as bactérias em dois grupos: Gram-positiva e Gram-negativas (LAMBERT, 2002).

Figura 9: Coloração de Gram. A. Gram negativas. B. Gram positivas



Fonte: GIANANTE, 2014

Assim, ao se estabelecer um comparativo, as Gram-positivas apresentam parede celular mais espessa, constituída principalmente de peptideoglicanos envolvendo a membrana citoplasmática, enquanto as Gram-negativas apresentam uma ou poucas camadas de peptideoglicano e entre a membrana externa e a citoplasmática tem um espaço periplasmático contendo componentes de sistema de transporte de ferro, proteínas, açúcares, enzimas hidrolíticas e outros metabolitos (MURRAY, 2006).

Quimicamente também apresentam distinções, já que na parede celular das Gram-positivas podem ocorrer moléculas de ácido teicóico, lipoteicóico e polissacarídeos C, sendo estes fatores de virulência, enquanto que a das Gram-negativas pode conter em sua membrana externa lipopolissacarídeo, lipoproteína e porinas (DENYER; MAILLARD, 2002; JORGE, 2012a).

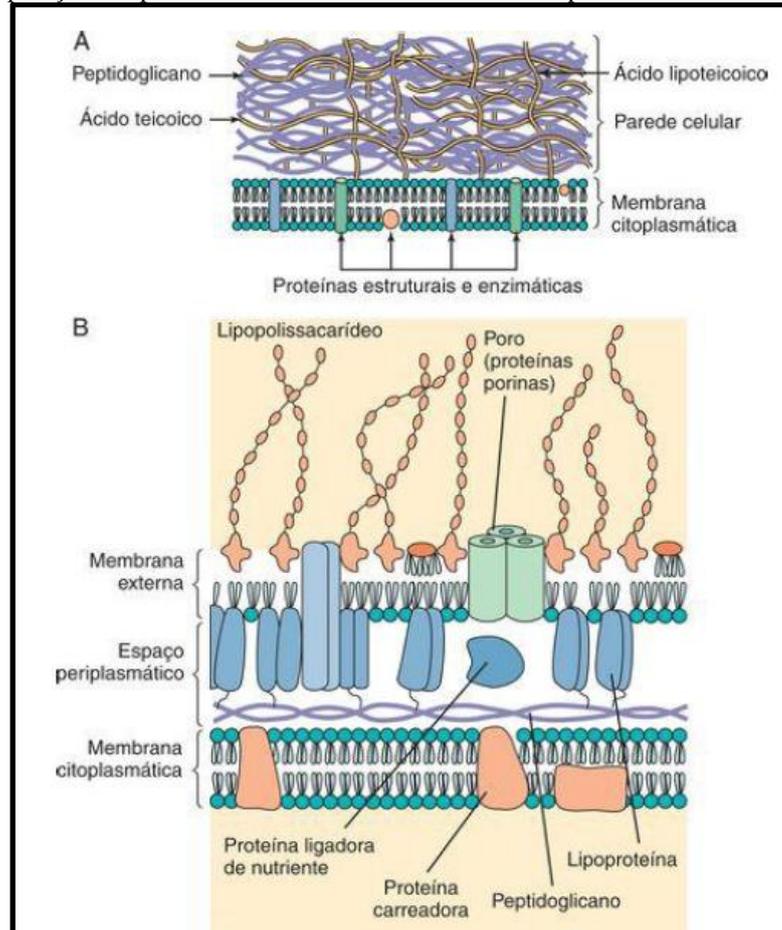
Por conseguinte, com relação à permeabilidade de moléculas, ocorre diferenciação entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, já que nestas últimas ela representa uma barreira significativa de penetração de grandes moléculas (p. ex., proteínas como a losozima) e as moléculas hidrofóbicas (p.ex., alguns antibióticos) hidrofílicas, restringindo a taxa de penetração e excluindo as moléculas maiores, enquanto nas Gram-positivas a parede celular é permeável.

A Figura 10 permite a comparação entre as paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, onde as Gram-positivas são carregadas negativamente devido à presença em sua parede celular de ácido teicóico e ácidos lipoteicoicos e uma espessa camada de peptideoglicanos, favorecendo assim a ligação de moléculas catiônicas a estas superfícies.

Já as Gram-negativas, que são compostas por uma membrana externa composta por uma camada fina de peptideoglicano e uma membrana externa rica em lipopolissacarídeo

(LPS), fosfolípídeos e outras proteínas os quais apresentam carga negativa que têm grande afinidade por cátions tais como cálcio e magnésio, sendo estas ligações responsáveis pela estabilidade termodinâmica do exterior da membrana (GEORGE; HAMBLIN; KISHEN, 2009; HANCOCK, 1984).

Figura 10: Comparação das paredes celulares de bactérias. **a.** Gram-positivas. **b.** Gram-negativas.



Fonte: Murray *et al.*, 2006

Considerando que os agentes antibacterianos devem ser direcionados à membrana ou ao interior da célula, a permeabilização em um microrganismo por uma estrutura química permite evidenciar a sua sensibilidade ao agente, já que a impermeabilidade celular é particularmente relevante na resistência de bactérias Gram-negativas. Assim, a estrutura da parede celular das bactérias Gram-negativas com a presença de um envoltório externo são muitas vezes responsáveis pela impermeabilidade das mesmas os agentes terapêuticos (DENYER; MAILLARD, 2002).

3.2.1 *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli*, Fig.11, pertencente à Família das Enterobactérias, é um bacilo Gram-negativo de tamanho médio (0,5 μm de diâmetro e 1,0 -3,0 μm de comprimento), não esporulado e móvel com flagelos peritricos (TORTORA et al., 2010).

Figura 11: *Escherichia coli*



Fonte: Cotter, 2015

Considerado o microrganismo anaeróbio facultativo mais abundante no cólon e nas fezes de organismos endotérmicos, a *E. coli* é a mais comum e importante dentre as sete espécies que compõe o Gênero *Escherichia*, diferentemente dos outros dois principais patógenos intestinais, a *Salmonella* e a *Shigella*, essa bactéria é fermentadora de lactose (OLSVIK et al., 1991). Além disso, a *E. coli* possui diversos fatores de virulência, dentre eles: os pili, endotoxina, e exotoxinas (enterotoxinas), causadoras de diarreia aquosa e diarreia sanguinolenta e síndrome hemolítica-urêmica (FREMAUX et al., 2008).

Embora alguns sorotipos de *E. coli* sejam considerados coabitante não patogênico, ou seja, capazes de colonizar sem que ocorra o desenvolvimento de alguma doença, outros estão associados a diversas patologias, sendo a principal causadora de infecções do trato urinário, podendo ainda, causar diarreia, doenças imunológicas e infecções hospitalares como septicemia e meningite (LAW et al., 2013; SHARIFF et al., 2013).

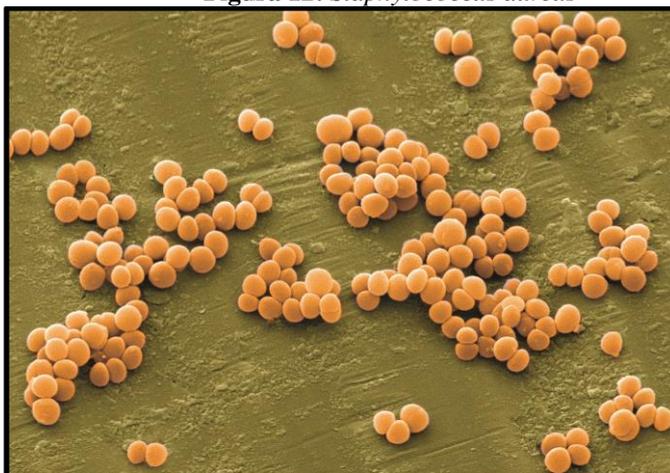
Segundo Franco e Landgraf (2008), a presença desta espécie em alimentos é um indicador de contaminação microbiana de origem fecal e, portanto, de condições higiênicas insatisfatórias.

De acordo com a virulência, manifestações clínicas e epidemiologia as linhagens patogênicas são agrupadas em cinco classes: EPEC (*E. coli* enteropatogênica clássica), EIEC (*E. coli* enteroinvasiva), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EHEC (*E. coli* entero-hemorrágica) e EAaggEC (*E. coli* enteroagregativa) (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A EPEC é considerada a principal causa de diarreia aquosa e potencialmente fatal em crianças, enquanto que a EHEC causa diarreia ainda mais grave, provocando uma variedade de sintomas que variam desde gastroenterite aguda como até mesmo síndrome hemolítica -urêmica (LAW et al., 2013).

O tratamento de infecções por esta bactéria depende do local atingido e do grau de resistência do isolado específico. Alguns antibióticos, como sulfonamidas, trimetoprim, ampicilina e cloranfenicol frequentemente apresentam um maior grau de resistência em relação à ciprofloxacina. Embora a administração de trimetoprim - sulfametoxazol ou loperamida possa diminuir a duração dos sintomas, a terapia antibiótica usualmente não é indicada para doenças diarreicas causadas por *E. coli*, sendo mais tipicamente indicado apenas a reidratação (ROGERS et al., 2011).

3.2.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus são cocos Gram-positivos com aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, não esporulados, anaeróbios facultativos e geralmente não encapsulados. Podem ser encontrados na forma isolada, aos pares, em cadeias curtas ou até mesmo em cacho (Figura 12). Os estafilococos são produtores de catalase, considerada um importante fator de virulência e essencial no processo de identificação, uma vez que transforma o peróxido de oxigênio (H₂O₂) em água e oxigênio inofensivos (JORGE, 2012b).

Figura 12: *Staphylococcus aureus*

Fonte: MOURA, 2015

A capacidade hemolítica *S. aureus* possibilita o desenvolvimento de um halo de hemólise ao redor das colônias formadas em placas de ágar sangue (AS), enquanto que a capacidade de fermentar o manitol garante a produção do ácido lático. Além disso, esta bactéria produz coagulase, enzima que provoca a coagulação do plasma por ativar a protrombina, originando a trombina, que catalisa a ativação de fibrinogênio e origina o coágulo de fibrina (BASTOS et al., 2013).

O ser humano é considerado o reservatório natural deste microrganismo, pois está presente em diversas partes do corpo, tais como fossas nasais, garganta, intestinos e pele, sendo as narinas consideradas o maior sítio de colonização, com prevalência de aproximadamente 40% na população adulta, podendo ser ainda maior dentro de hospitais (GRUNDMANN et al., 2009). Apesar da diversidade de quadros clínicos, três tipos são principais: as infecções superficiais, como abscessos cutâneos e feridas; as infecções sistêmicas, como bacteremia, endocardite, osteomielite, artrite, miosite tropical e pneumonia, e os quadros tóxicos, como síndrome do choque tóxico, síndrome da pele escaldada e a intoxicação alimentar (DAVID; DAUM, 2010).

A intoxicação alimentar causada por *S. aureus* ocorre principalmente através da ingestão de enterotoxinas pré-formadas em alimentos contaminados através do manuseio de indivíduos, portadores assintomáticos ou que apresentam algum tipo de infecção, geralmente cutânea. Se a contaminação dos mesmos for por armazenamento inadequado, a bactéria irá prontamente se desenvolver, já que as enterotoxinas são termoestáveis, portanto não são destruídas pelo cozimento dos alimentos. As manifestações clínicas, como náuseas, vômitos,

diarreias e dores abdominais acontecem cerca de quatro horas após a ingestão do alimento e duram em média 12 horas (ARGUDÍN et al., 2010).

A produção de toxinas e indução da inflamação pirogênica é essencial no processo de patogênese, sendo o abscesso cutâneo a lesão típica de infecção causada pelo *S. aureus* (JORGE, 2012b). Normalmente, os abscessos sofrem necrose e depois drenam para o exterior (furúnculos), mas em alguns casos também podem ser disseminados na corrente sanguínea. Além disso, suturas e cateteres intravenosos são importantes fatores predisponentes à infecção por *S. aureus*, conseqüentemente uma das mais frequentes causas de bacteremia em pacientes internados, podendo até mesmo evoluir para sepse, que apresenta alta taxa de mortalidade (VAN HAL et al., 2012). Dentre as várias toxinas e enzimas produzidas por essa bactéria, três exotoxinas clinicamente importantes são: a enterotoxina, a toxina da síndrome do choque tóxico e a esfoliatina (LENVINSON, 2010; TRABULSI; ALTHERTHUM, 2008).

A taxa de mortalidade por infecções por *S. aureus* era de aproximadamente 90% antes da década de 1940, quando iniciou o uso de antibióticos. Estes são geralmente eficazes contra bactérias Gram-positivas (penicilinas, cefalosporinas, eritromicina, aminoglicosídeos, tetraciclina e cloranfenicol), no entanto a capacidade de desenvolver resistência é alta principalmente em pacientes hospitalizados (BASTOS et al., 2013).

A penicilina, atualmente teve seu efeito significativamente reduzido através da ampla disseminação de amostras resistentes, principalmente pela produção de β -lactamases. Em caso de infecções estafilocócicas graves, especialmente por cepas resistentes a meticilina (penicilina resistente a β -lactamase), a vancomicina é considerada o fármaco de escolha. Entretanto, o surgimento recente de cepas com suscetibilidade diminuída a esse fármaco, conhecidas como Vancomycin Intermediate *S. aureus* (VISA) (HOWDEN et al., 2010; CHAMBERS, DELEO, 2009).

3.2.3 Resistência a antibiótico

A resistência microbiana aos antibióticos podem ser por mecanismos intrínsecos ou adquiridos por transmissão de material genético ou mutação (RICE; BONOMO, 2005; VEIGA, 1984).

A resistência intrínseca ou natural de um microrganismo pode ocorrer sem previa exposição a algum de antibiótico e esta acontece por três possíveis razões: ausência de um

processo metabólico influenciável pelo antibiótico; presença de enzimas com capacidade de inativar antibiótico; ou presença de particularidades inerentes à morfologia bacteriana (RICE; BONOMO, 2005; VEIGA, 1984).

A resistência adquirida pode ocorrer por três diferentes mecanismos: a alteração da permeabilidade, da ação da bomba de efluxo e o mecanismo enzimático que consequentemente altera a estrutura química do antibiótico (HAWKEY, 1998; PATERSON; YU, 1999; TENOVER et al., 1999).

Para esse processo acontecer dois grandes mecanismos estão presentes: mutação num *loci* do cromossoma ou transferência horizontal de genes. Os genes responsáveis pela resistência normalmente codificam enzimas que inativam os antibióticos ou reduzem a permeabilidade das células (McGOWAN, 2004; BAPTISTA, 2013).

As mutações induzidas são decorrentes da ação da radiação, como ultravioleta ou ionizante, pela presença dos agentes alquilantes, da hidroxilamina ou da presença de espécies reativas de oxigênio (ROS). Se o erro for um benefício para a bactéria, como no caso da resistência aos antibióticos, então tenderá a predominar naquela espécie (MURRAY, 2006).

A transferência horizontal de genes é um processo de obtenção de material genético entre bactérias da mesma espécie ou espécies diferentes. Pode ocorrer por transformação, transdução ou conjugação e ainda por transposição (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008; TODAR, 2012).

3.2.4 Fotoinativação microbiana

A terapia fotodinâmica antimicrobiana, também conhecida como inativação fotodinâmica, quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana e fotoinativação microbiana representa uma alternativa para eliminação de bactérias, fungos e vírus (PERUSSI, 2007).

A inativação fotodinâmica de microrganismos pode ocorrer mecanismos descritos anteriormente (seção 3.1.3). Então, quando a inativação ocorre pelo mecanismo do tipo I inicialmente ocorre a abstração de hidrogênios alílicos de moléculas insaturadas como fosfolípídeos presentes na membrana plasmática pelo FS, iniciando-se outras reações redox onde espécies reativas são formadas próximo ao alvo biomolecular. Na presença de oxigênio formam-se os radicais superóxido e hidroxil (HO) que podem reagir com biomoléculas ou combinar-se formando assim peróxido de hidrogênio *in situ*, levando a eventos citotóxicos,

com formação de hidróperóxido lipídico. A peroxidação de lipídeos tem efeito determinante na integridade da membrana, levando a diminuição de sua fluidez e aumento na permeabilidade de íons. No mecanismo do tipo II, o oxigênio singlete atua como espécie oxidante das moléculas envolvidas na manutenção e estruturação da parede/membrana celular como peptídeos, fosfolipídios, esteróis e outras (WAINWRIGHT, 2002).

Os alvos celulares na TFD em células de mamíferos são principalmente lisossomos, mitocôndrias e membranas plasmáticas, enquanto a membrana externa das células microbianas possui importância fundamental como uma barreira protetora impedindo a danificação do DNA (PERUSSI, 2007)

As bactérias Gram-positivas, como a *S. aureus*, normalmente são mais susceptíveis à fototoxicidade do que as Gram-negativas, como a *E. coli*, essa diferença está relacionada com presença da camada externa que atua como uma barreira de proteção física e funcional nas bactérias Gram-negativa, enquanto nas bactérias Gram-positivas somente a camada de peptidoglicano assume essa função (KHARKWAL, 2011).

3.2.4.1 Resistência à inativação fotodinâmica

A TFD não está ligada à mediação de radicais químicos; tem ação localizada, o FS age produzindo oxigênio singlete, que não possui especificidade por sítio de ação, reagindo com vários substratos biomoleculares; tornando assim, pouco provável o desenvolvimento de cepas resistentes (FONTANA et al, 2009).

Outra vantagem da TFD é a morte bacteriana rápida, diminuindo a necessidade da manutenção de altas concentrações de substâncias químicas por períodos prolongados, como no caso do uso de antibióticos e antissépticos. Além disso, nem o FS nem a luz utilizada devem ser bactericidas quando utilizados isoladamente, a morte das bactérias pode ser controlada limitando a região irradiada, evitando, assim, a destruição da microbiota normal em outros locais (HAMBLIN; HASAN, 2004; JORI, 2006; FEDERICO, 2002).

Apesar de ainda não existirem estudos consistentes sobre resistência bacteriana à ação da TFD, só o fato dela não agir indiscriminadamente no organismo do hospedeiro já constitui um benefício significativo nos complexos sistemas bacterianos (PRATES, 2005).

Cassidy et al. (2010) sugeriram que os microrganismos são incapazes de desenvolver resistência à TFD devido a morte da bactéria *non-situ* específico pelo FS. Estudos anteriores tem tentado induzir a resistência à TFD, matando repetidamente e renovando amostras bacterianas. No entanto, o mais provável é que as bactérias irão desenvolver resistência crescente, na presença de um estressor de baixo nível, assim como ocorreu com o uso de antibióticos, através de mecanismos como: taxa de absorção diferente ou o efluxo, alteração da permeabilidade, diminuição da ativação de fármacos, e aumento inativação do medicamento (PRATES, 2005; HOLMBERG, 1984).

Tudo isso só prova que novos estudos devem ser realizados para averiguar se há tal resistência à TFD ou se depende do FS utilizado ou, se ainda, qualquer tratamento prévio pode ou não favorecer a formação da resistência (DENIS, 2011 b).

3.2.4.1 Pesquisa da inativação microbiana através da TFD

O uso da TFD na inativação de microrganismos é um tratamento alternativo para infecções, que se encontra em fase experimental. Até o momento, os estudos publicados buscam determinar parâmetros apropriados para aplicação clínica da TFD, avaliando diferentes FS, fontes de luz, concentração dos FS e tempo de irradiação (WAINWRIGHT, 1998). Diante disso, a seguir serão citados alguns estudos publicados sobre TFD em microrganismos:

- OLIVEIRA et al., 2014, utilizaram AM a 50 μ M como FS, Laser (660 nm, 100 mW e 9 J) como fonte de luz e as bactérias *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. A metodologia utilizada foi a contagem de Unidades formadoras de colônias (UFC), resultando na eliminação de 74,90 % de *C. albicans*, 72,41 % de *P. aeruginosa*, 96,44 % de *E. faecalis* 95,42 % de *S. aureus*;

- TAVARES et al., 2010, usaram o 5,10,15-tris (1-Metilpiridínio-4-il) -20-(pentafluorofenil) porfirina triiodeto (Tri-Py + -Me-PF) como FS, as bactérias *Vibrio fischeri* e *Escherichia coli*, luz branca (40 Wm⁻²) como fonte de luz, contagem de UFC e resultou na eliminação de 99,99% dos microrganismos;

- MONTEIRO et al, 2014, estudaram o composto fenotiazinico (azul de toluidina e AM, 12,5 μ g/mL) em *Staphylococcus aureus* irradiada com o laser vermelho ($\lambda = 660$ nm, 12

J/cm²) através de contagem de UFC. O FS sozinho reduziu 64,8% de UFC e sua associação com a luz do laser resultou em 84,2% de inibição;

- GEROLA et al., 2011a, analisaram a clorofila, feofitina, feoforbideo, clorofila metalada com Zn e Cu e feoforbideo-Zn em *S. aureus*, *E. coli*, *Candida albicans*, utilizando LED vermelho na intensidade de 5 mW por contagem UFC. Com exceção do feoforbideo-Zn que é um bom bactericida no escuro os outros FS tiveram efeito significativo na TFD;

Observa-se que os tipos de FS são muito variados e a fonte de luz que mais se utiliza é o laser e o LED, principalmente na cor vermelha por estar na faixa da janela terapêutica, porém em intensidade e tempo de irradiações diversas.

Atualmente existem várias metodologias para avaliar a inibição microbiana de extratos vegetais e comerciais. Os métodos mais conhecidos são contagem de UFC, difusão em ágar, macrodiluição e microdiluição (OSTROSKY et al., 2008). Porém não se tem relato do uso dos dois últimos para monitorar o efeito da TFD, principalmente com a utilização da leitora de microplacas, como o proposto na presente investigação.

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados para o preparo das soluções foram: Metanol P.A (Dinâmica Ltda); Éter de petróleo P.A (Dinâmica Ltda); Solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) (Vetec); Dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec); Sulfato de magnésio anidro (Vetec); Ácido clorídrico 2% (HCl) (Dinâmica Ltda); AM (Dinâmica Ltda); EAM (Vetec-Sigma-Aldrich); Caldo Muller Hinton (Himedia); Caldo BHI (Himedia); Glicerina (Vetec); Cloridrato de vancomicina (Teuto); Água bidestilada para injeção estéril (Equiplex);

4.1.2 Equipamentos

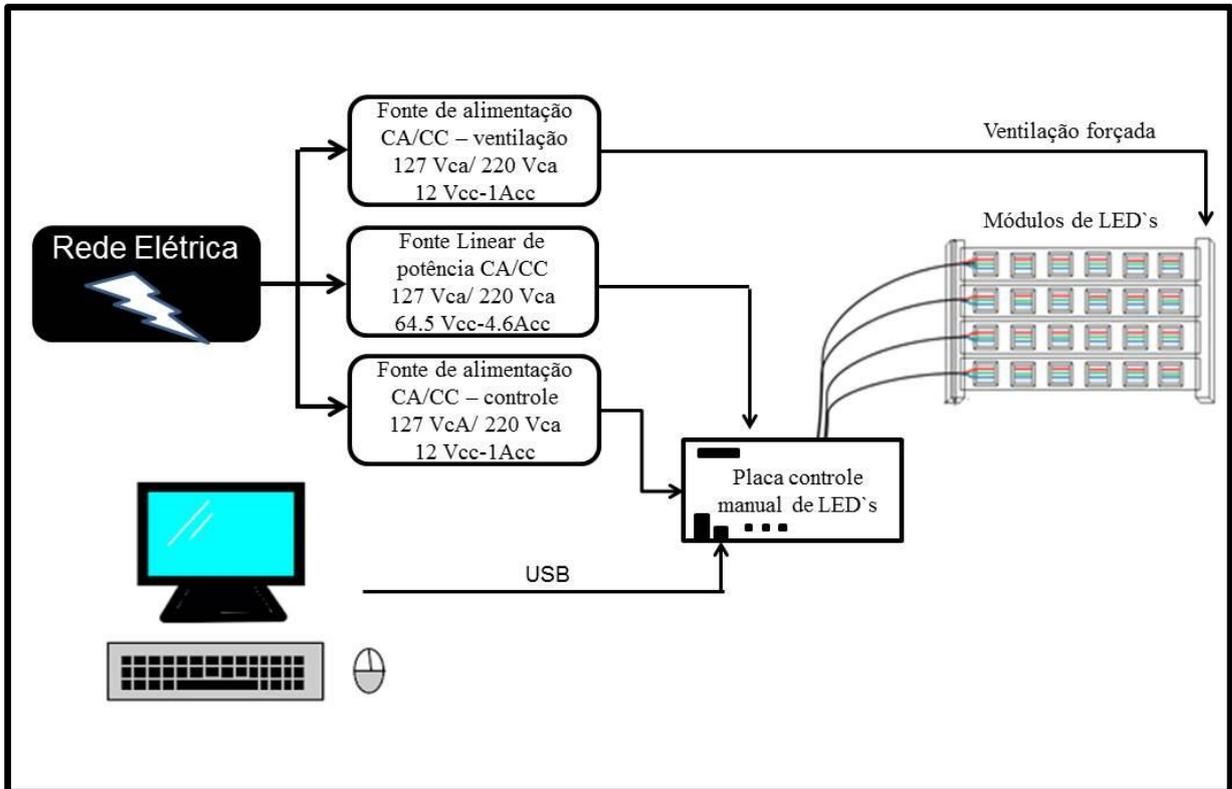
Os equipamentos utilizados foram: Balança analítica (Trade Labor); rotaevaporador (IKA[®] RV 10 basic.); Estufa bacteriológica (Fanem[®]); Câmera Incubadora com Agitação (Solab); Leitora de microplacas (Zenyth 200); Espectrofotômetro de Absorção portátil (USB 4000FL- OceanOptics[®]); Espectrofotômetro Cary 50 UV-vis (Varian); Autoclave vertical (Phesmatec); Sistema de irradiação por LED (desenvolvido pelo grupo de ótica aplicada – GOA).

4.1.3 Sistema de LED

A irradiação foi realizada por luz vermelha com comprimento de onda igual a 625 nm, utilizando um conjunto de 24 LED`s RGB, denominado de sistema de LED. Este sistema foi projetado e executado por pesquisadores do Grupo de Óptica Aplicada (GOA) da

Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD (Aparato de LED, Dourados, Brasil), cujo esquema está representado na Figura 13.

Figura 13: Representação esquemática simplificada do sistema de irradiação



Fonte: O autor

A medida da potência da luz vermelha irradiada nos testes foi realizada por meio de um medidor de potência (Newport/optical Power meter-model 1917-R) no comprimento de onda de 625 nm. A intensidade da luz utilizada no presente experimento foi de 16,25 mW/cm².

4.2 Procedimentos

4.2.1 Material vegetal

O EXCL e a feofitina (FEO) foram obtidos a partir de folhas da *Cichorium intybus*, conhecida popularmente como chicória selvagem, chicória do mato, rúcula selvagem, rúcula do mato, entre outros. Estas foram coletadas em julho de 2015, ao lado do prédio da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia – FACET, na Universidade Federal da Grande Dourados, na cidade de Dourados.

4.2.2 Preparo do extrato

O extrato da *Cichorium intybus* foi preparado com as folhas do vegetal, previamente mergulhadas em água fervente por dois minutos e posteriormente lavadas com água fria e secas entre papel toalha para retirar o excesso de água. Então foram pesadas aproximadamente 1 Kg de folhas e maceradas durante 30 minutos em uma mistura de 1 L de metanol e 500 mL de éter de petróleo. A extração ocorreu em banho de gelo e em frasco Erlenmeyer protegido da luz. A solução dos pigmentos extraídos foi filtrada à vácuo e armazenada em outro frasco protegido de luminosidade. Repetiu-se o procedimento por mais duas vezes com as mesmas folhas e em seguida lavou-se novamente com uma mistura de 500 mL de éter de petróleo e 500 mL de éter dietílico (SOARES, 2006). A solução extraída foi transferida para um funil de separação, em frações e lavadas com solução aquosa saturada de NaCl. A fase orgânica foi separada e depois lavada por mais 3 vezes com água destilada (Fig. 14). A água foi eliminada adicionando sulfato de magnésio anidro e deixando por 10 minutos. Filtrou-se e rotaevaporou (40°C, 650 mmHg e 90 rpm).

Figura 14: Fases do extrato após processo de lavagem



Fonte: O autor

O EXCL rotaevaporado foi pesado e redissolvido em um volume de 10 mL de DMSO 100%. A partir deste, foi obtido uma solução de 15,60 mg/mL em DMSO a 10% (m/v) para realizar os testes microbiológicos. O EXCL foi caracterizado em espectrofotômetro UV-Vis.

4.2.3 Obtenção da feofitina

A FEO (Figura 15) foi obtida por meio da substituição do cátion Mg^{2+} por dois prótons ligados aos nitrogênios centrais, adicionando-se algumas gotas de ácido clorídrico 2 mol/L em EXCL preparado em DMSO 10% na concentração de 15.6 mg/mL, de acordo com a metodologia proposta por Maestrin et. al. (2009) e Filho et. al. (2012) com adaptações. O produto obtido foi caracterizado através do espectro de absorção na região do visível.

Figura 15: Diferença da coloração da feofitina em comparação com o extrato: **a.** Extrato. **b.** Feofitina



Fonte: O Autor

4.2.4. Corantes

Os corantes utilizados para realização dos testes, o AM e a EAM, foram obtidos comercialmente. Então preparou-se as soluções na concentração de 15,60 mg/mL utilizando água destilada autoclavada e armazenou-se protegido da luz.

4.2.5. Antibiótico

O antibiótico utilizado foi o cloridrato de vancomicina na concentração de 1 mg/mL. Esta solução foi preparada com água bidestilada para injeção estéril, poucos minutos antes do início dos testes devido à estabilidade do antibiótico preparado.

4.2.6 Teste Microbiológico

4.2.6.1 Cepas microbianas

Os experimentos foram realizados com as cepas padrões: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922. As cepas bacterianas foram mantidas em Caldo Muller Hinton (CMH) acrescido de 20% de glicerol e mantido em ultrafreezer (Panasonic) a -80 °C.

4.2.6.2 Preparo das suspensões bacterianas

As suspensões bacterianas (SB) foram preparadas com a adição das cepas bacterianas em caldo Muller Hinton e mantidas em uma câmara incubadora com agitação a 37°C, durante 24 horas. Após foram realizado placas e incubadas novamente por 24 horas a 37 °C. A suspensão bacteriana utilizada foi preparada em caldo Muller Hinton, a partir de colônias isoladas e representativas do microrganismo presentes na placa de isolamento primário, de forma a obter uma densidade ótica de aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, com turvação de 0,5 da escala de McFarland. A confirmação foi realizada através da leitura espectrofotométrica a 625 nm. Posteriormente, foi realizada uma diluição de 1:10 em CMH, obtendo-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios (CLSI, 2006).

4.2.6.3 Determinação da Inibição Bacteriana

Para a determinação da inibição bacteriana dividiu-se as culturas em dois grupos: uma que ficou protegido da luz e outra que recebeu irradiação de luz vermelha na intensidade de $16,25 \text{ mW/cm}^2$, durante 1 hora.

O teste foi realizado pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006).

As microplacas de 96 orifícios possuem 12 colunas enumeradas de 1 a 12 e 8 linhas nomeadas de A à H. Então foram adicionados $100 \cdot \mu\text{L}$ de caldo Mueller-Hinton nos poços das colunas 3 ao 12, das linhas B ao H. No primeiro poço dessas colunas foram adicionados $200 \mu\text{L}$ das amostras testes (antibiótico 1 mg/mL ; EXCL $15,60 \text{ mg/mL}$; FEO $15,60 \text{ mg/mL}$, AM $15,60 \text{ mg/mL}$ e EAM $15,60 \text{ mg/mL}$). A partir dos poços iniciais, diluições seriadas foram realizadas nos demais poços com o auxílio de micropipeta automática, obtendo-se concentrações decrescentes, variando de $15,60$ a $0,12 \text{ mg/mL}$ para EXCL, feofitina, EAM e AM e de 1 a $0,01 \text{ mg/mL}$ para vancomicina. Em todos esses poços foram acrescidos $50 \mu\text{L}$ de suspensão bacteriana. Nas duas primeiras colunas foram realizados os testes controles do meio de cultura, crescimento bacteriano, DMSO e DMSO + HCl.

Ao realizar o teste do grupo protegido do escuro deixou-se as culturas em repouso durante 30 minutos para os FS permear as células bacterianas e iniciou as leituras de absorbância que foram feitas de 15 em 15 minutos durante 24 horas. No outro grupo, após o repouso de 30 minutos das culturas, irradiou-se durante 1 hora em luz de LED vermelha com intensidade de $16,25 \text{ mW/cm}^2$ para então iniciar as leituras de absorbância.

Em cada microplaca foram realizados os testes de um grupo e um tipo de bactéria. Os testes foram realizados em duplicata. A Figura 16 mostra esquematicamente a organização dos testes nas microplacas.

onde, A_0 e A representam a absorvância inicial e absorvância em função do tempo, respectivamente, portanto:

$\Delta A = 0$ representa que não houve crescimento e nem morte bacteriana;

$\Delta A > 1$ representa um aumento no número total de bactérias (crescimento bacteriano);

$\Delta A < 1$ representa uma redução no número total de bactérias (morte bacteriana);

$\Delta A = -1$ representa que houve morte total das bactérias;

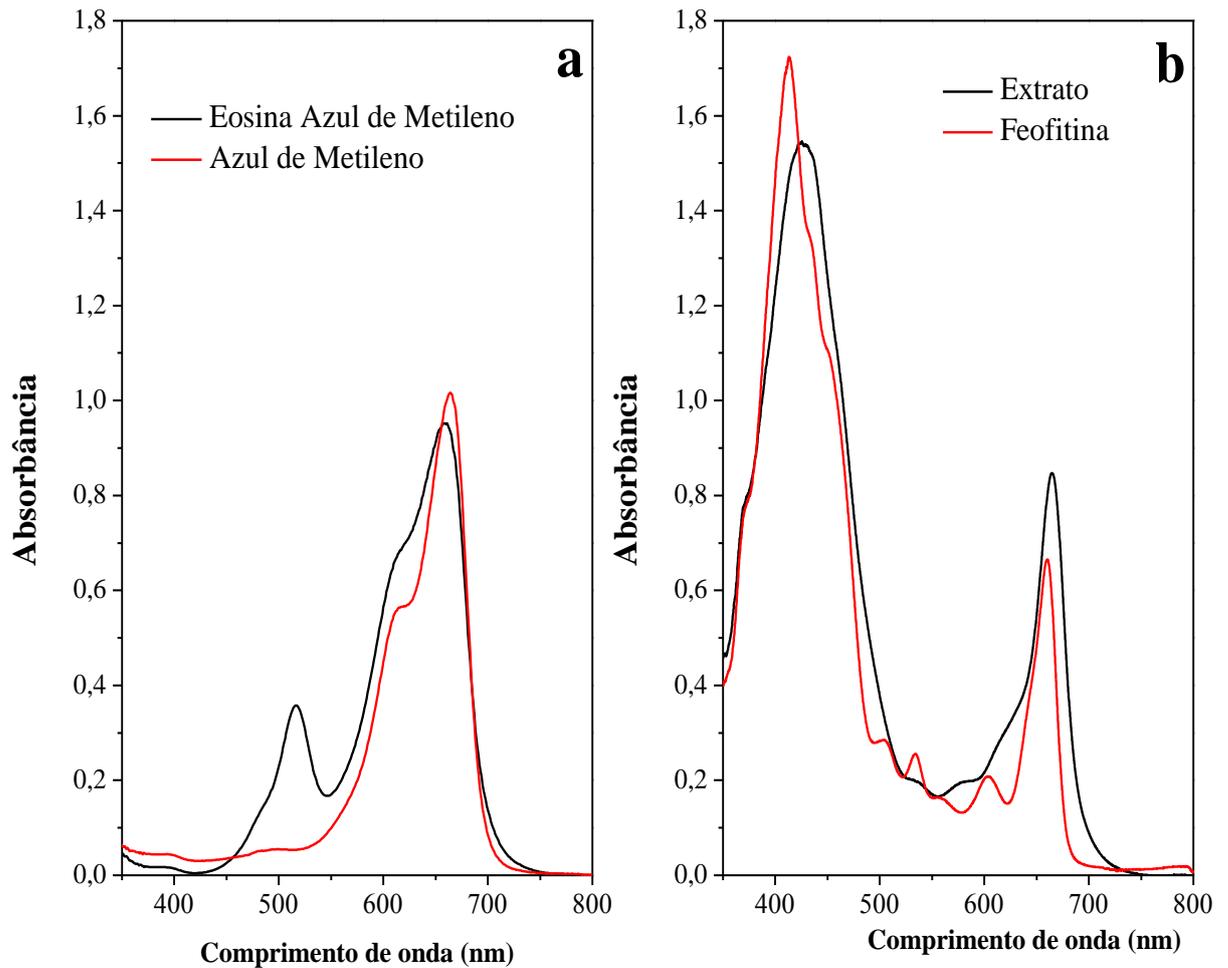
Os resultados foram plotados através do programa ORIGIN 8.5, considerando a média e o erro padrão (SE) da média das absorvâncias obtidas nas leituras.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Absorção dos fotossensibilizadores

As curvas de absorção molecular dos FS (Fig. 17) analisados mostram o comportamento das absorbâncias semelhantes ao encontrados na literatura e de grande importância para TFD, uma vez que possuem uma banda intensa na região em torno de 650 nm, dentro da “janela terapêutica” (FERREIRA, 2015).

Figura 17: Espectros de absorção dos fotossensibilizadores. **a.** Eosina azul de metileno e azul de metileno. **b.** Extrato e feofitina



A radiação vermelha e infravermelha penetram os tecidos biológicos com menor perda, atingindo estruturas mais profundas, entre 600 e 1200 nm (NIEMZ, 2007; BAROLET, 2008). Portanto, esta característica permite que esses corantes sejam usados como FS na TFD.

O tempo de exposição do FS com as bactérias antes da irradiação podem contribuir para a mecanismo de inativação celular, ou seja o FS penetra em diferentes posições até alcançar uma ótima localização no interior da célula bacteriana, melhorando posteriormente a eficácia da TFD (USACHEVA et al., 2001; WAGNER et al., 1998).

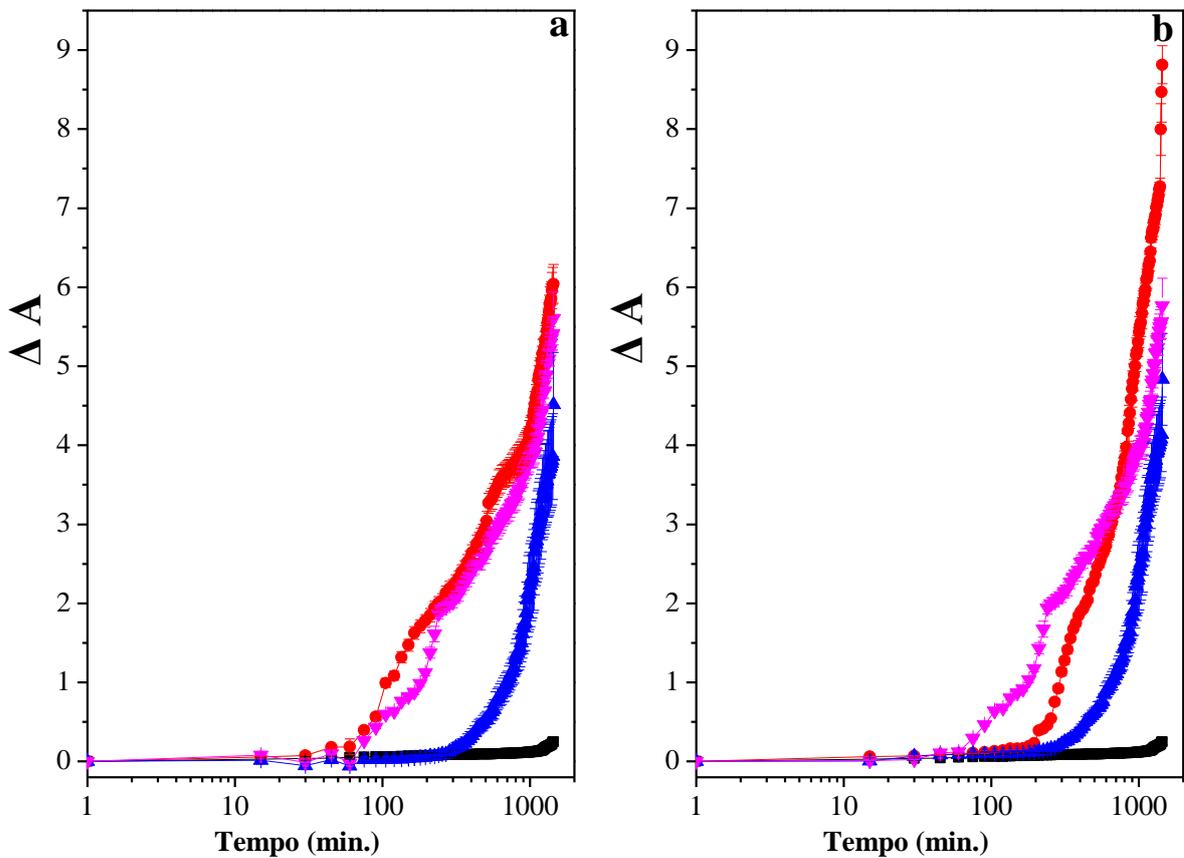
Esta afirmação foi comprovada na pesquisa de Silva, 2012, quando fez um estudo da TFD com o tempo de pré-irradiação de 5, 10 e 30 minutos utilizando o azul de metileno, verde de malaquita e o rosa bengala como FS. Neste estudo, foi demonstrando que o aumento do tempo de pré- irradiação produz aumento na taxa de inibição microbiana comparando ao grupo controle. Portanto, nesta presente pesquisa foi deixado os FS em contato com as bactérias utilizadas por 30 minutos antes de serem irradiadas e analisadas.

5.2 Controles

A atividade antimicrobiana das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram avaliadas perante 4 tipos de FS, sendo estes EXCL, FEO, EAM e AM. Para solubilizar o EXCL foi utilizado o reagente Dimetilsulfóxido a 10% e para FEO foi acrescido neste, gotas de ácido clorídrico a 2% até visualizar a mudança de cor e o pH ficar em torno de 2. A suspensão bacteriana e as diluições seriadas dos testes utilizou-se Caldo Muller Hinton.

Então, em todos os experimentos foram realizado também controles do meio de cultura, do crescimento microbiano e dos solventes utilizados (Fig 18).

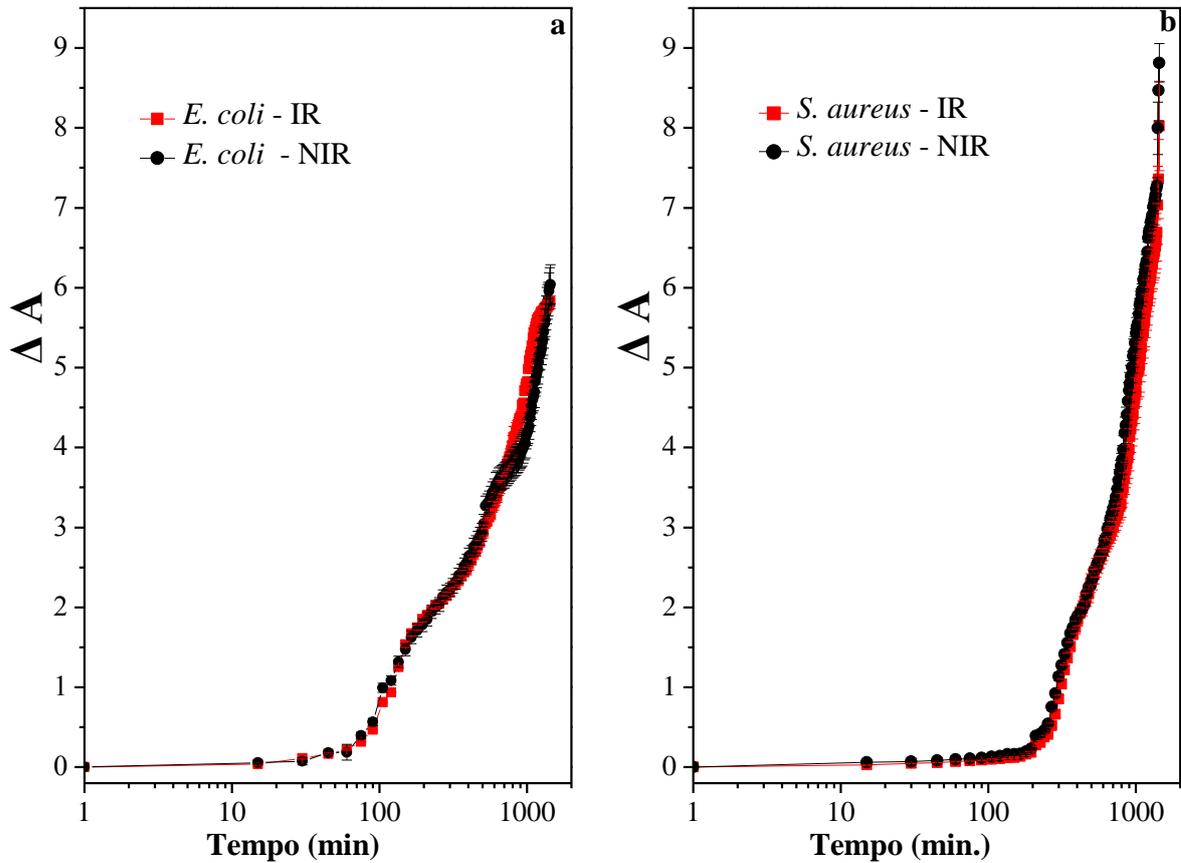
Figura 18: Variação da absorção das amostras controles sem irradiação: (■) meio de cultura, (●) crescimento bacteriano, (▲) DMSO e (▼) DMSO + HCl. **a.** *E. coli*. **b.** *S. aureus*



Os controles demonstram que o meio de cultura puro não obteve crescimento bacteriano demonstrando assim que estava estéril; o crescimento das duas bactérias foi satisfatório já que houve crescimento até o final do teste, mostrando que o meio estava apto para o crescimento neste período; e tanto o DMSO a 10% quanto o DMSO a 10% acidificado não afetaram o crescimento bacteriano.

Como já descrito, os testes foram divididos em dois grupos: O grupo que recebeu 1 hora de irradiação (IR) e o não irradiado (NIR). A Figura 19 é a comparação do controle de crescimento bacteriano da *E. coli* e *S. aureus* com e sem irradiação, nos mostrando que somente a luz vermelha não consegue inibir o crescimento bacteriano.

Figura 19: Comparação do crescimento bacteriano irradiado (IR) e sem irradiação (NIR). **a.** *E. coli*. **b.** *S. aureus*.

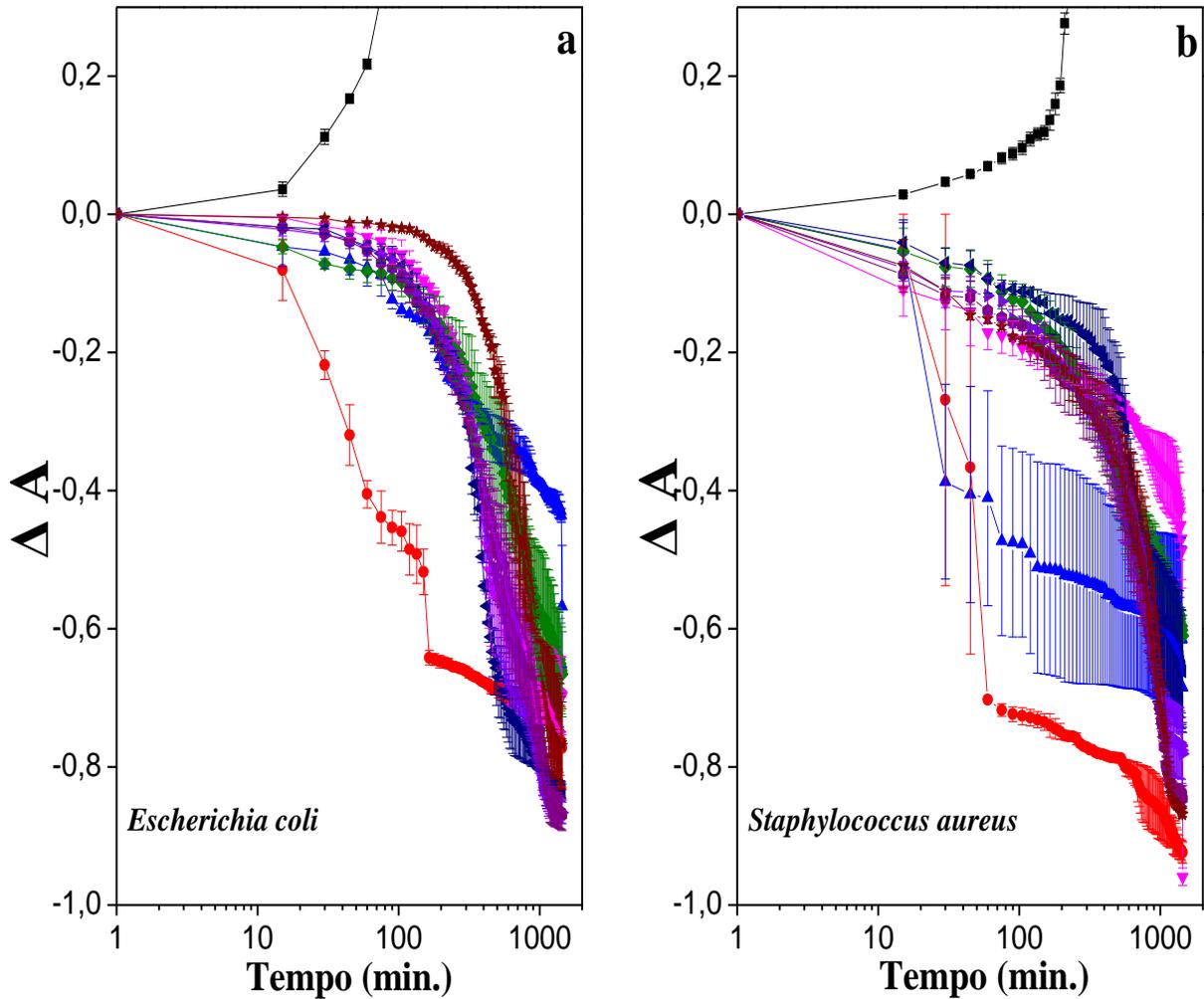


5.3 Avaliação da terapia fotodinâmica

A inativação fotodinâmica foi avaliada utilizando EXCL, FEO, EAM e AM em oito diferentes concentrações (15,60 mg/mL; 7,80 mg/mL; 3,90 mg/mL; 1,95 mg/mL; 0,98 mg/mL; 0,49 mg/mL; 0,24 mg/mL; 0,12 mg/mL).

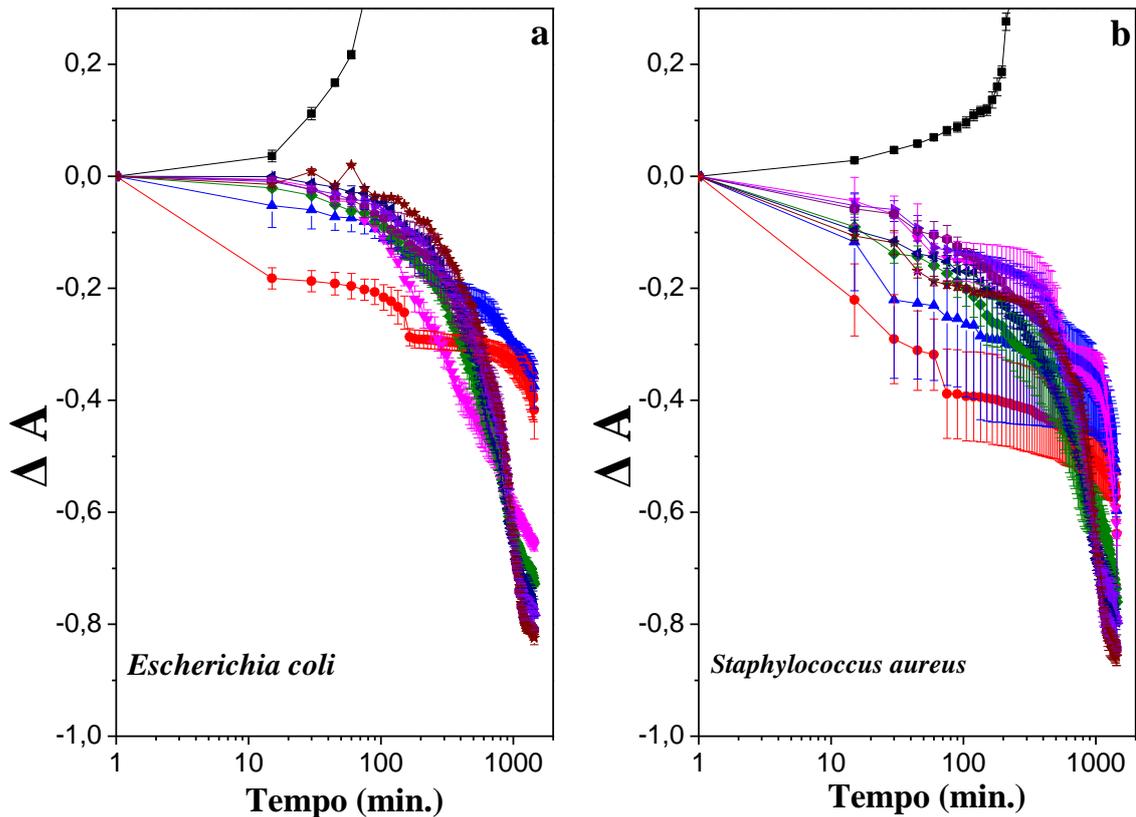
A Figura 20 apresenta as curvas de inativação microbiana da *E. coli* e *S. aureus* perante todas as concentrações analisadas do EXCL. Neste observa-se que as duas bactérias tiveram praticamente o mesmo comportamento de inativação, sendo dependente da concentração.

Figura 20: Inibição bacteriana do extrato irradiado em diferentes concentrações: (■) Crescimento bacteriano; (●) 15,6 mg/mL; (▲) 7,80 mg/mL; (▼) 3,90 mg/mL; (◆) 1,95 mg/mL; (◄) 0,98 mg/mL; (►) 0,49 mg/mL; (●) 0,24 mg/mL (★) 0,12 mg/mL. **a.** Comparação da inibição do crescimento bacteriano da *E. coli* em diferentes concentrações de extrato irradiado em luz vermelha. **b.** Comparação da inibição do crescimento bacteriano da *S. aureus* em diferentes concentrações de extrato irradiado em luz vermelha.



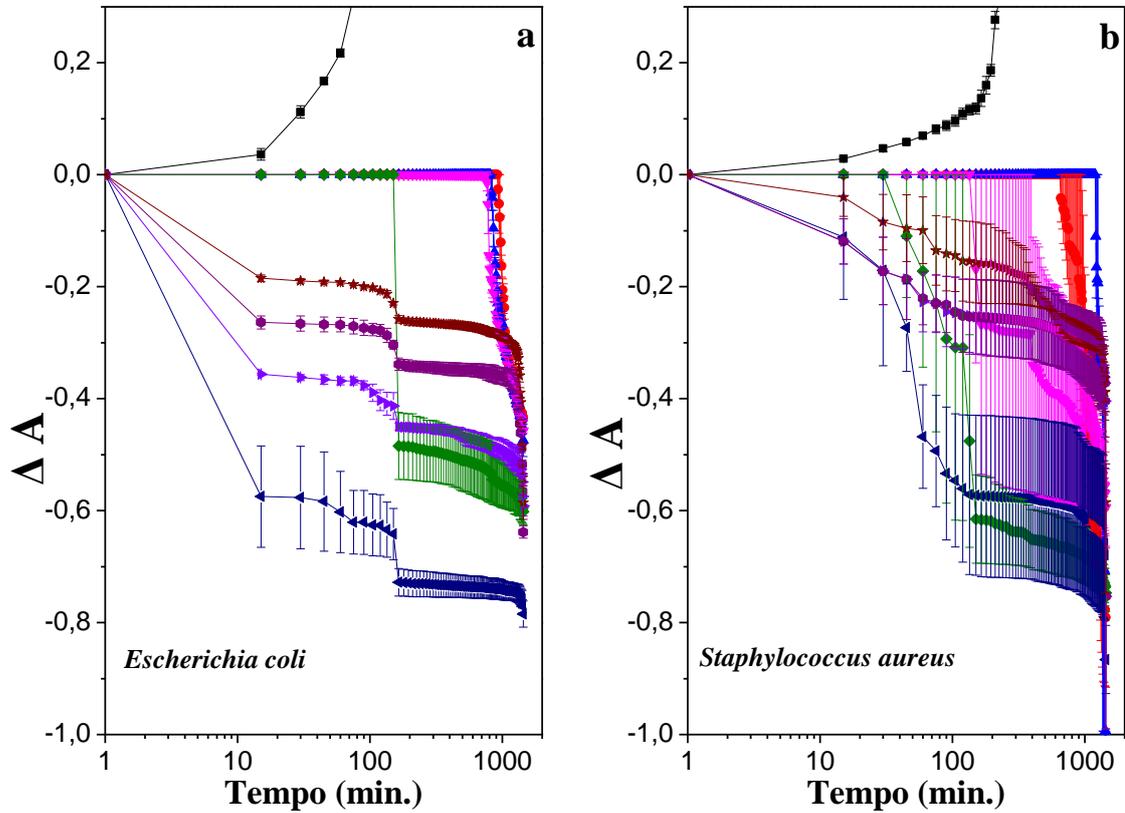
A Figura 21 nos mostra o comportamento das bactérias perante ação da FEO irradiada nas oito concentrações analisadas. E novamente o comportamento foi dependente de concentração e similar nos dois microrganismos.

Figura 21: Inibição bacteriana da ofeofitina irradiado em diferentes concentrações: (■) Crescimento bacteriano; (●) 15,6 mg/mL; (▲) 7,80 mg/mL; (▼) 3,90 mg/mL; (◆) 1,95 mg/mL; (◄) 0,98 mg/mL; (►) 0,49 mg/mL; (●) 0,24 mg/mL (★) 0,12 mg/mL. **a.** Comparação da inibição do crescimento bacteriano da *E. coli* em diferentes concentrações de feofitina irradiado em luz vermelha. **b.** Comparação da inibição do crescimento bacteriano da *S. aureus* em diferentes concentrações de feofitina irradiado em luz vermelha.



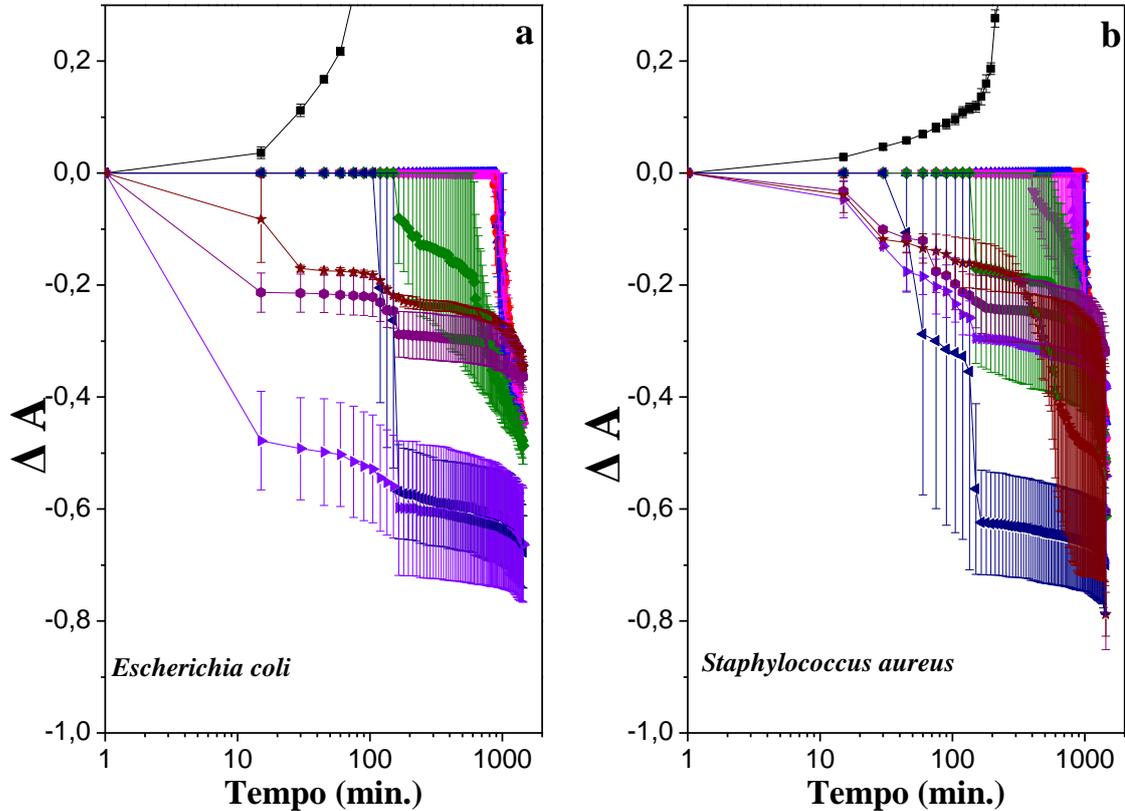
A Figura 22 mostra a inibição do crescimento bacteriano diante da EAM em diluições seriadas de 15,60 até 0,12 mg/mL. Observa-se que as maiores concentrações obtiveram menor inativação do que as concentrações intermediárias. Acredita-se que este fato tenha ocorrido em ocasião da cor deste FS, que em altas concentrações não permite a efetiva penetração da luz na amostra, diminuindo a irradiação do FS.

Figura 22: Inibição bacteriana do eosina azul de metileno irradiado em diferentes concentrações: (■) Crescimento bacteriano; (●) 15,6 mg/mL; (▲) 7,80 mg/mL; (▼) 3,90 mg/mL; (◆) 1,95 mg/mL; (◄) 0,98 mg/mL; (►) 0,49 mg/mL; (●) 0,24 mg/mL (★) 0,12 mg/mL. **a.** Comparação da inibição do crescimento bacteriano da *E. coli* em diferentes concentrações de eosina azul de metileno irradiado em Luz vermelha. **b.** Comparação da inibição do crescimento bacteriano da *S. aureus* em diferentes concentrações de eosina azul de metileno irradiado em Luz vermelha.



Assim como no caso da EAM, a Figura 23 também nos mostram que as maiores concentrações do AM induziram uma inibição microbiana menor que as concentrações intermediárias.

Figura 23: Inibição bacteriana do azul de metileno irradiado em diferentes concentrações: (■) Crescimento bacteriano; (●) 15,6 mg/mL; (▲) 7,80 mg/mL; (▼) 3,90 mg/mL; (◆) 1,95 mg/mL; (◄) 0,98 mg/mL; (►) 0,49 mg/mL; (●) 0,24 mg/mL (★) 0,12 mg/mL. **a.** Comparação da inibição do crescimento bacteriano da *E. coli* em diferentes concentrações de azul de metileno irradiado em luz vermelha. **b.** Comparação da inibição do crescimento bacteriano da *S. aureus* em diferentes concentrações de azul de metileno irradiado em luz vermelha.



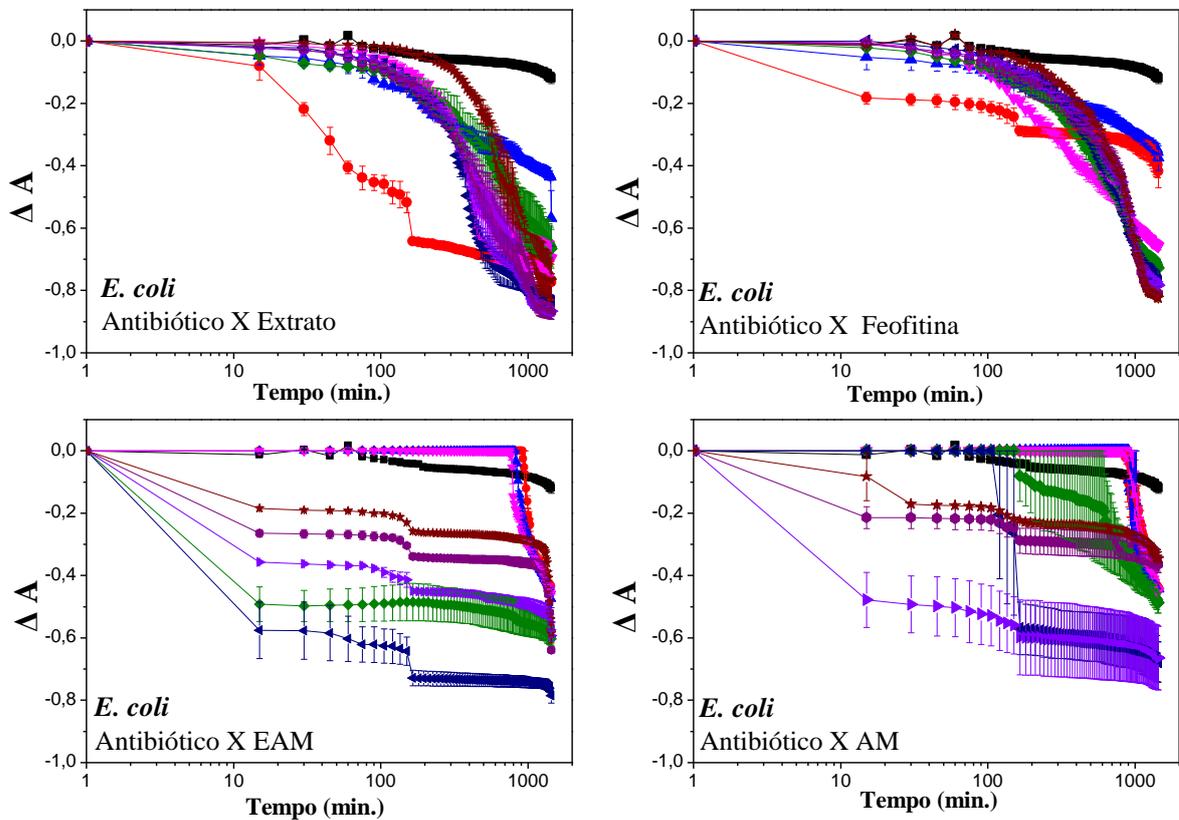
O uso do azul de metileno como bactericida e FS têm resultados controversos na literatura. Usacheva et al. (2001) avaliaram, *in vitro*, a eficácia do azul de metileno e do azul de toluidina como fotossensibilizadores letais em *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Hemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e obteve uma redução do crescimento bacteriano, mas a inibição foi dependente da intensidade da luz, concentração do FS e da bactéria. Portanto, o aumento da concentração dos FS resultou em uma maior inibição microbiana.

Este efeito foi visualizado no presente estudo, no entanto as concentrações utilizadas foram diferentes e maiores ocorrendo então, a saturação da eosina azul de metileno e do azul de metileno nas maiores concentrações e assim dificultando o resultado real da inibição bacteriana devido a limitações da leitora de microplacas utilizada para análise.

5.4 Terapia fotodinâmica X Antibiótico

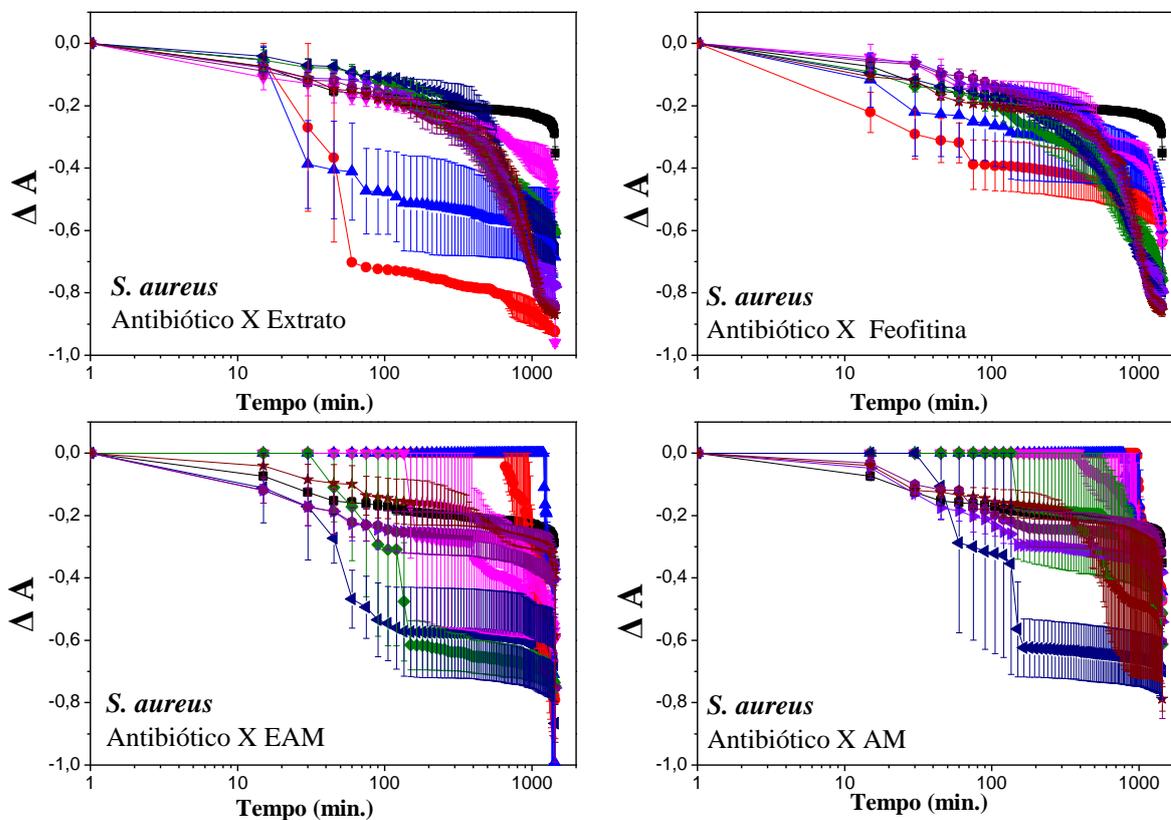
A Figura 24 mostra a comparação do efeito do antibiotico vancomicina a 1 mg/mL com os FS: EXCL, FEO EAM e AM. Observa-se que os FS foram tão eficientes quanto ao antibiotico ou até tiveram uma maior inibição da *E. coli*.

Figura 24: Comparação do efeito do antibiotico a 1 mg/mL com os fotossensibilizadores testados em *E. coli*, com irradiação: (■) Antibiótico 1 mg/mL; (●) FS 15,60 mg/mL; (▲) FS 7,80 mg/mL; (▼) FS 3,90 mg/mL; (◆) FS 1,95 mg/mL; (◄) FS 0,98 mg/mL; (►) FS 0,49 mg/mL; (●) FS 0,24 mg/mL; (★) FS 0,12 mg/mL. **a.** Extrato. **b.** Feofitina. **c.** Eosina azul de metileno. **d.** Azul de metileno



Similarmente, a Figura 25 mostra a comparação do antibiotico Vancomicina a 1 mg/mL com os FS: EXCL, FEO, EAM e AM, mas para a bactéria *S. aureus*.

Figura 25: Comparação do efeito do antibiótico a 1mg/mL dos fotossensibilizadores testados em *S. aureus*, com irradiação: (■) Antibiótico 1 mg/mL; (●) FS 15,60 mg/mL; (▲) FS 7,80 mg/mL; (▼) FS 3,90 mg/mL; (◆) FS 1,95 mg/mL; (◄) FS 0,98 mg/mL; (►) FS 0,49 mg/mL; (◐) FS 0,24 mg/mL; (★) FS 0,12 mg/mL. **a.** Extrato. **b.** Feofitina. **c.** Eosina azul de metileno. **d.** Azul de metileno



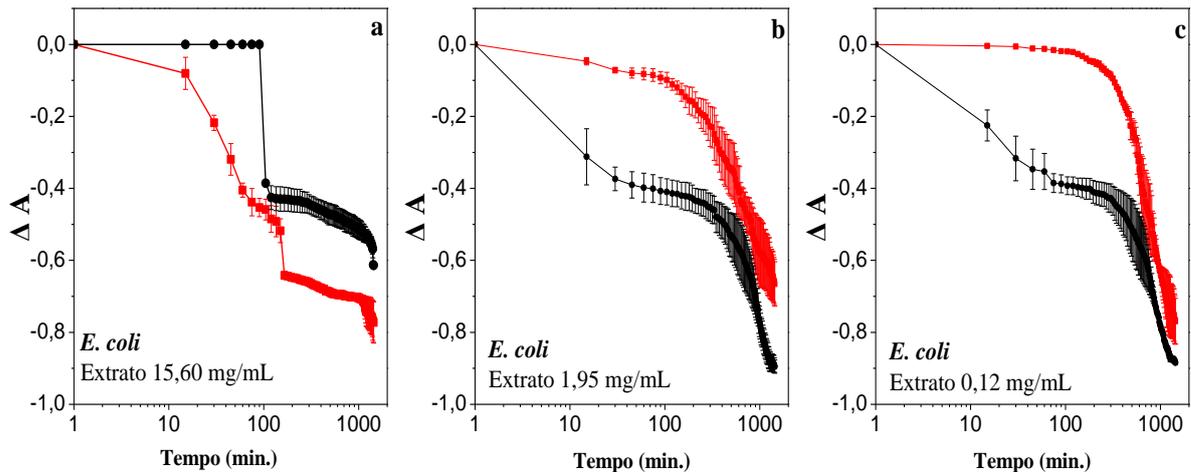
O efeito do antibiótico em concentrações baixas é semelhante ao efeito dos FS analisados, no entanto, devemos lembrar que a TFD possui algumas vantagens em relação ao uso de antibióticos comerciais como: eliminação rápida e imediata da célula bacteriana; não ocorre mecanismo de resistência dos microrganismos, é uma aplicação local e poucos efeitos adversos (GURGEL, 2013).

5.5 TFD X Efeito do Fotossensibilizador

Agora, para visualizar mais facilmente a diferença entre as amostras não irradiadas e as que foram irradiada em luz LED vermelha por 1 hora, foi realizado uma análise comparativa com 3 curvas de concentrações de cada FS (concentração alta, intermediária e baixa).

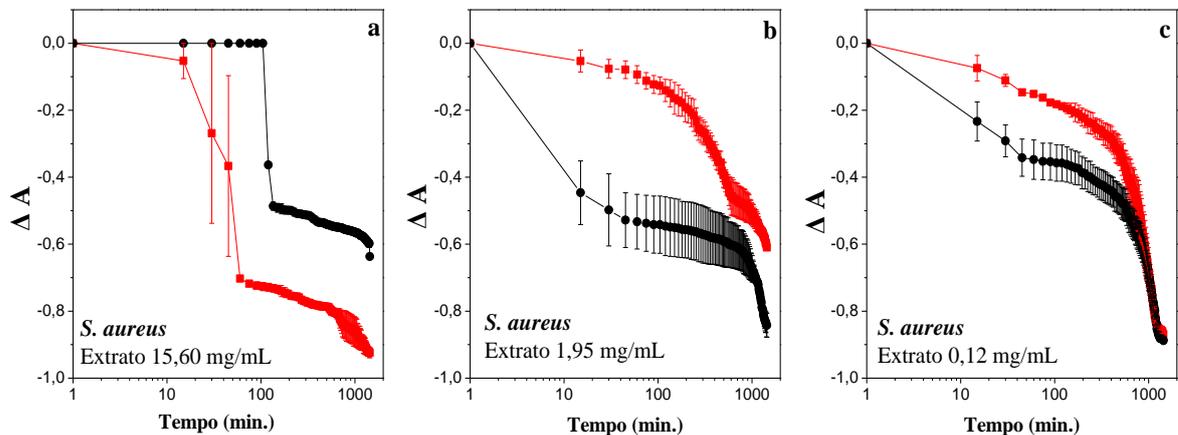
A comparação do EXCL irradiado e não irradiado para *E. coli*, apresentado na Figura 26, demonstra que a luz intensificou a inibição da *E. coli* na concentração mais alta, no entanto em concentrações menores obtiveram resultados próximos ao grupo não irradiado apenas no final das 24 horas de teste.

Figura 26: Comparação da extrato irradiado (■) e sem irradiação (●) em *E. coli*. **a.** Extrato na concentração de 15,60 mg/mL. **b.** Extrato na concentração de 1,95 mg/mL. **c.** Extrato na concentração de 0,12 mg/mL.



Na Figura 27, observa-se que a intensificação da inibição microbiana pela ação da luz utilizando o EXCL na maior concentração analisada como FS, agora em *S. aureus*. Mas nas demais amostras verifica-se que a luz não intensificou a ação do FS, alcançando inibição próxima à amostra não irradiada ao final do período de leitura.

Figura 27: Comparação da extrato irradiado (■) e sem irradiação (●) em *S. aureus*. **a.** Extrato na concentração de 15,60 mg/mL. **b.** Extrato na concentração de 1,95 mg/mL. **c.** Extrato na concentração de 0,12 mg/mL.



A Figura 28 demonstra que FEO irradiada inibiu menos a *E. coli* que o FS não irradiado nas três concentrações e a Figura 29 mostra que as concentrações mais altas tiveram efeito pela ação da luz para *S. aureus*. Esse fato pode ser por acasão da diferença da camada lipídica dos dois microrganismo, ou seja, a bactéria Gram-positiva, *S. aureus*, não possui a membrana externa em sua estrutura, camada esta formada por peptidoglicano. Portanto torna-se mais suscetível a TFD do que as Gram-negativas que possuem essa camada de proteção adicional, dificultando a penetração de FS (PELOI et al., 2008).

Figura 28: Comparação da feofitina irradiado (■) e sem irradiação (●) em *E. coli*. **a.** Feofitina na concentração de 15,60 mg/mL. **b.** Feofitina na concentração de 1,95 mg/mL. **c.** Feofitina na concentração de 0,12 mg/mL.

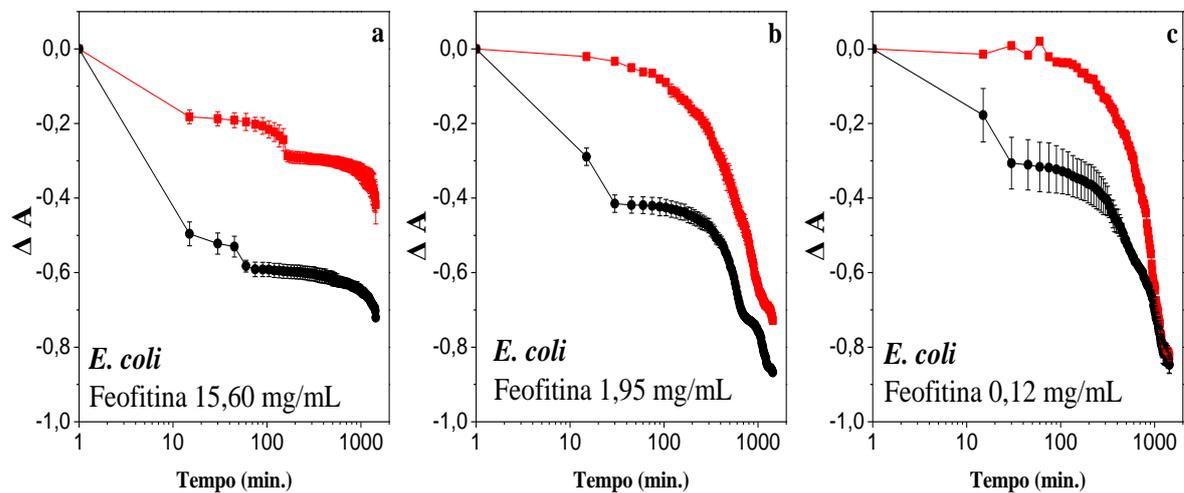
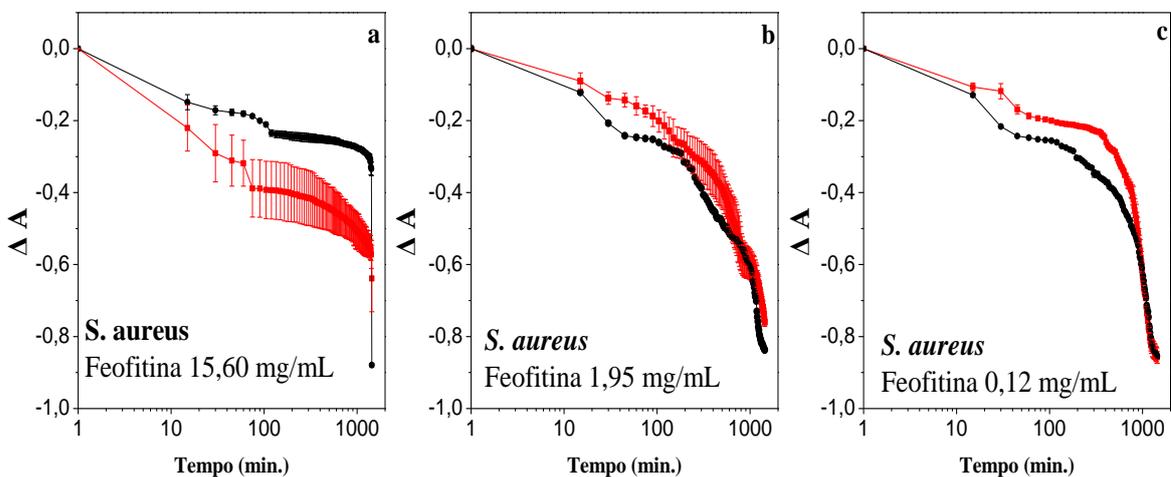


Figura 29: Comparação da feofitina irradiado (■) e sem irradiação (●) em *S.aureus*. **a.** Feofitina na concentração de 15,60 mg/mL. **b.** Feofitina na concentração de 1,95 mg/mL. **c.** Feofitina na concentração de 0,12 mg/mL.



A bactéria *S. aureus*, Gram-positiva, não possui uma bicamada lipídica em sua membrana externa, sendo por isso mais suscetível a TFD do que outros microrganismos com essa camada de proteção adicional o que dificulta a penetração de FS (PELOI et al., 2008). Apesar da luz ter apresentado pouca inativação dos microrganismos, o grupo irradiado teve um efeito mais aparente na bactéria Gram positiva do que na Gram negativa.

O trabalho de Gerola (2010), mostra que o efeito bactericida da clorofila e da FEO foi potencializado pela iluminação; a ativação fotodinâmica mostrou-se dependente da concentração, porém em altas concentrações obteve-se uma saturação provavelmente relacionada à presença de autoagregados que diminuem a formação de 1O_2 . Neste foi utilizado uma intensidade de LED vermelho de 30 mW (dose de energia aplicada de 6 J/cm^2) durante 30 min e não é relatado ao certo a concentração utilizada dos FS.

As Figuras 30 e 31 mostram a diferença da inibição da EAM em *E. coli* e na *S. aureus* com a presença e ausência de irradiação. Nota-se que apesar da curva concentração intermediária nos mostrar que em alguns momentos a EAM teve o efeito intensificado pela luz, no contexto geral esse efeito é praticamente igual a curva do FS não irradiado.

Figura 30: Comparação da eosina azul de metileno irradiado (■) e sem irradiação (●) em *E. coli*. **a.** Eosina azul de metileno na concentração de 15,60 mg/mL. **b** Eosina azul de metileno na concentração de 1,95 mg/mL. **c.** Eosina azul de metileno na concentração de 0,12 mg/mL.

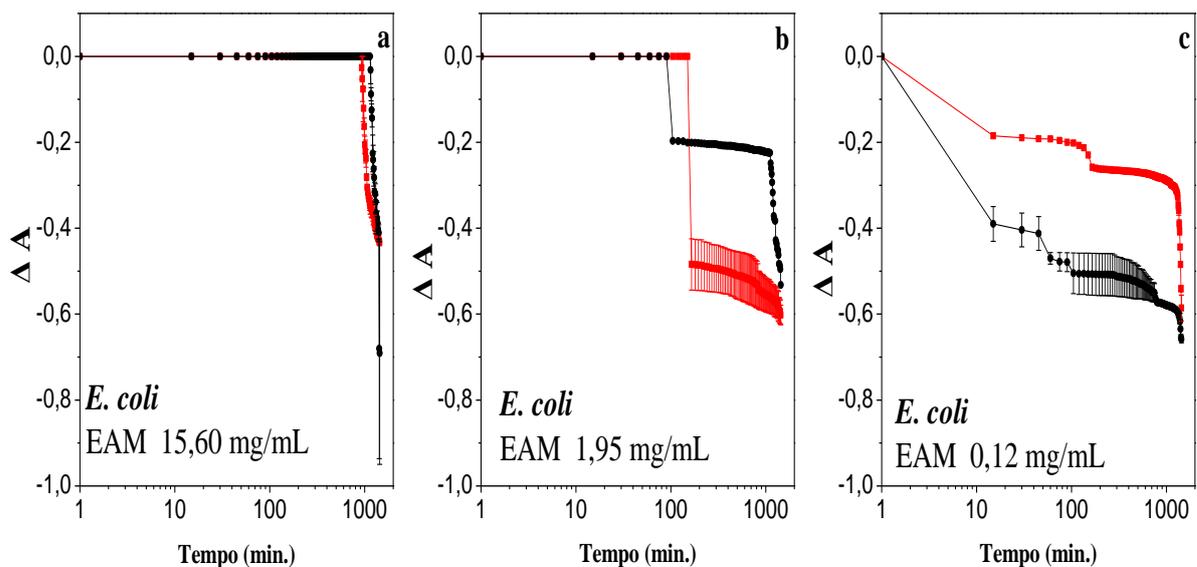
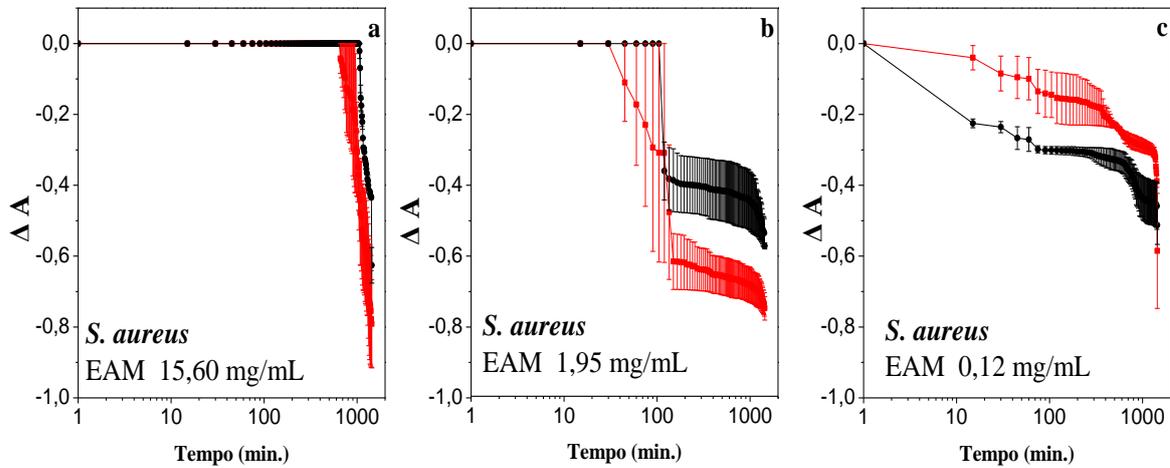


Figura 31: Comparação da eosina azul de metileno irradiado (■) e sem irradiação (●) em *S.aureus*. **a.** Eosina azul de metileno na concentração de 15,60 mg/mL. **b.** Eosina azul de metileno na concentração de 1,95 mg/mL. **c.** Eosina azul de metileno na concentração de 0,12 mg/mL.



O AM considerado um FS com características desejáveis para o uso em TFD, pois pode gerar altas concentrações de oxigênio singlete, consequentemente pode induzir a morte celular na terapia. Além disso, o AM pode também causar a formação de radicais que levam a danos em biomoléculas (SEVERINO et al., 2003; TARDIVO et al., 2005). No entanto, nas Figuras 32 e 33 observamos que a luz não intensificou a ação do AM na bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

Figura 32: Comparação do azul de metileno irradiado (■) e sem irradiação (●) em *E.coli*. **a.** Azul de metileno na concentração de 15,60 mg/mL. **b.** Azul de metileno na concentração de 1,95 mg/mL. **c.** Azul de metileno na concentração de 0,12 mg/mL.

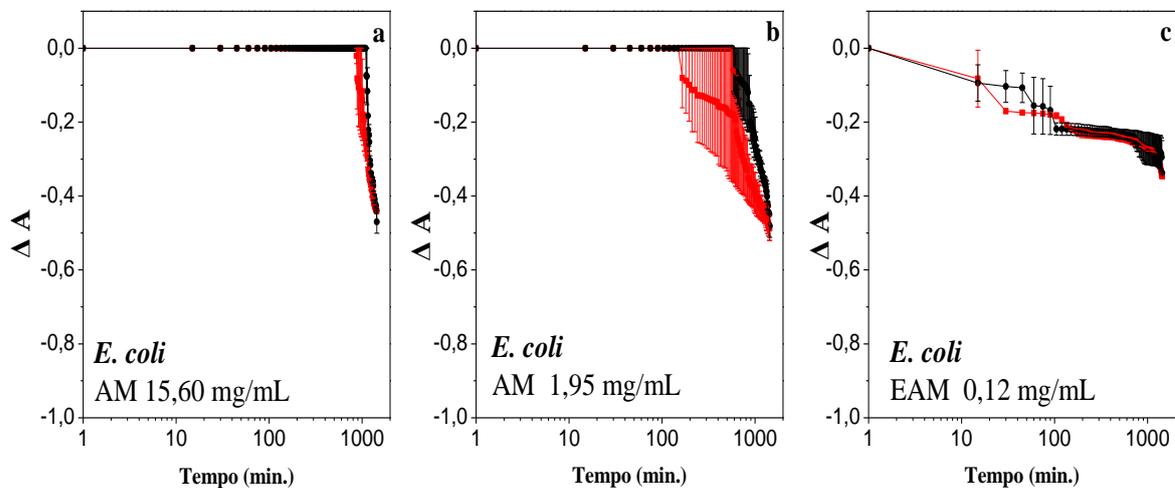
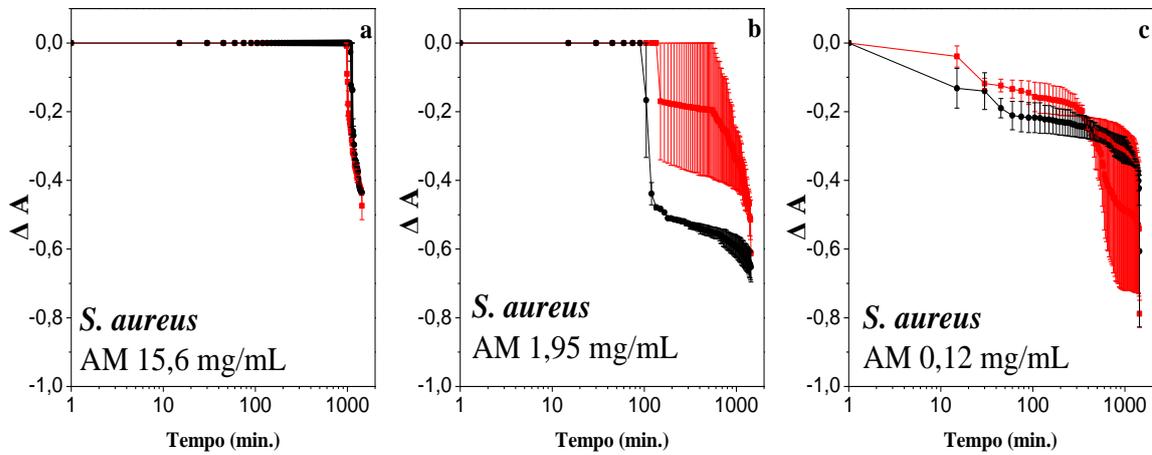
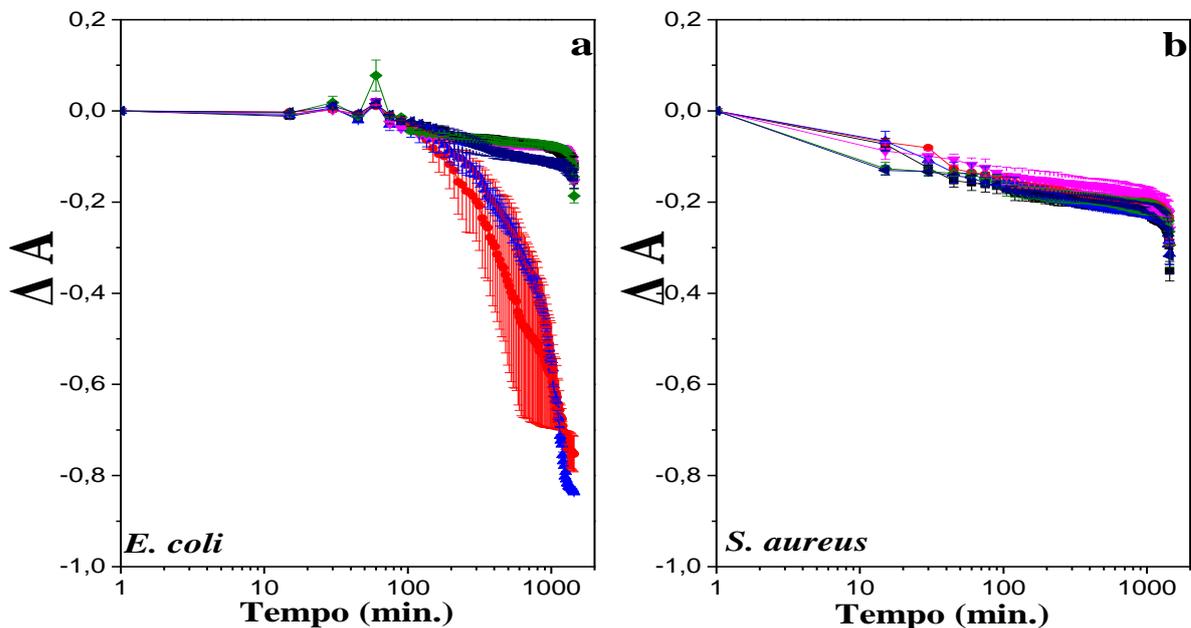


Figura 33: Comparação do azul de metileno irradiado (■) e sem irradiação (●) em *S.aureus*. **a.** Azul de metileno na concentração de 15,60 mg/mL. **b.** Azul de metileno na concentração de 1,95 mg/mL. **c.** Azul de metileno na concentração de 0,12 mg/mL.



A Figura 34 representa o antibiótico em três diferentes concentrações (1 mg/mL, 0,06 mg/mL e 0,01 mg/mL) em comparação ao grupo irradiado e não irradiado para as duas bactérias. Observa-se que a *S. aureus* teve uma inibição semelhante nos dois grupos, mas a *E. coli* apresentou um aumento na inibição em duas concentrações (0,06 mg/mL e 0,01 mg/mL) da vancomicina com a presença da luz.

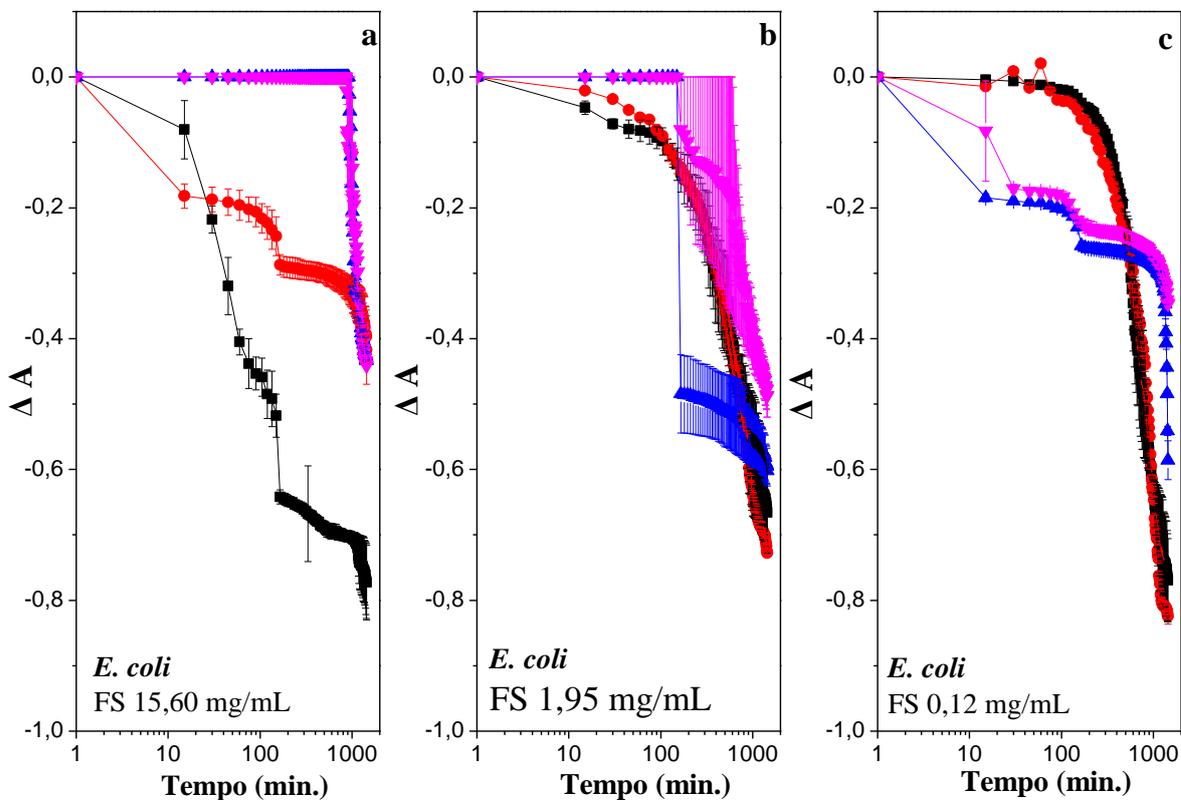
Figura 34: Comparação do antibiótico irradiado (IR): (■) 1 mg/mL; (●) 0,06 mg/mL; (▲) 0,01 mg/mL e sem irradiação (NIR): (▼) 1 mg/mL; (◆) 0,06 mg/mL; (◄) 0,01 mg/mL **a.** Inibição da *E.coli* com antibiótico nas concentrações de 1; 0,06 e 0,01 mg/mL, irradiado e sem irradiação. **b.** Inibição da *S. aureus* com antibiótico nas concentrações de 1; 0,06 e 0,01 mg/mL, irradiado e sem irradiação.



5.6 Comparação dos Fotosensibilizadores

Na sequência foi realizada uma comparação simplificada dos quatro FS analisados em três diferentes concentrações do grupo irradiado. A Figura 35 mostra esta comparação na bactéria *E. coli*. Observa-se que apesar da EAM e o AM serem corantes comerciais e já serem utilizados em alguns procedimentos médicos e até possuírem algumas propriedades bacteridas reconhecidas, o EXCL e a FEO que são corantes naturais obtiveram uma inibição semelhante ou até melhor.

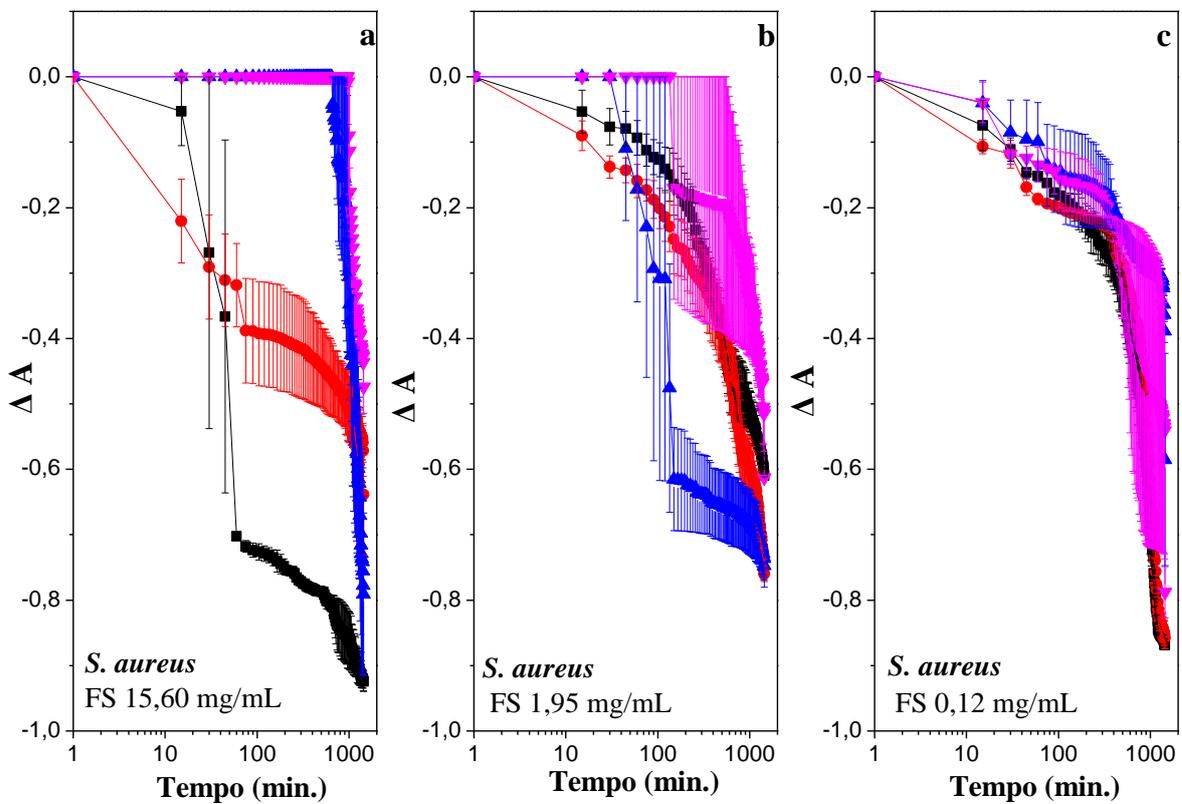
Figura 35: Comparação da inibição da *E. coli* pelos fotosensibilizadores testados, com ação luz: (■) Extrato; (●) Feofitina; (▲) Eosina azul de metileno; (▼) Azul de metileno. **a.** Fotosensibilizadores na maior concentração (15,60 mg/mL). **b.** Fotosensibilizadores em concentração intermediária (1,95 mg/mL). **c.** Fotosensibilizadores na menor concentração (0,12mg/mL)



A Figura 36 trás a comparação da inibição dos FS em *S. aureus* e também observa-se que os quatro obtiveram uma inibição semelhante ao final do experimento, mas também

observa-se que na figura a e b a EAM e o AM tiveram um decaimento rápido ao final, este fato provavelmente ocorreu devido ao fator de leitura de absorbância limitado em 4,00 no leitor de microplacas e como estes corantes tem uma cor intensa inibição é maior ao final das 24 horas.

Figura 36: Comparação da inibição da *S. aureus* pelos fotossensibilizadores testados, com ação luz: (■) Extrato; (●) Feofitina; (▲) Eosina azul de metileno; (▼) Azul de metileno. **a.** Fotossensibilizadores na maior concentração (15,60 mg/mL). **b.** Fotossensibilizadores em concentração intermediária (1,95 mg/mL). **c.** Fotossensibilizadores na menor concentração (0,12mg/mL)



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho mostrou que houve inibição bacteriana nas cepas ATCC de *E.coli* e *S. aureus*, na presença dos fotossensibilizadores EXCL, FEO, EAM e AM. No entanto esse resultado foi intensificado pela presença da luz somente nas maiores concentrações de EXCL para os dois microrganismos e de FEO para a bactéria Gram-positiva.

Com base nos resultados apresentados pode-se concluir que o EXCL, FEO, EAM e AM possuem características favoráveis para serem usados na fotoinativação microbiana apesar das condições e metodologia utilizada terem limitado a visualização deste efeito. Portanto, mais estudos são imprescindíveis para aperfeiçoar o sistema de iluminação, escolher concentração ideal dos FS, condições e protocolos do teste favoráveis.

As perspectivas futuras para utilização da fotoinativação microbiana são: tratamento de infecções localizadas, principalmente superficiais; tratamento de infecções em imunodeprimidos, que já são resistentes a uma grande variedade de antibióticos; desinfecção de fluidos sanguíneos, desinfecção de materiais hospitalares, odontológicos entre outros. Entretanto, para que a fotoinativação possa substituir o uso de antimicrobiano e consequentemente diminuir o desenvolvimento de resistência.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKROYD, R. et al. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, p. 656-669, 2001.

AGOSTIANO, A. et al. Relevance of the chlorophyll phytyl chain on lamellar phase formation and organisation. **Biophysical Chemistry**, v. 84, p. 189-194, 2000.

ALLISON, R. R. et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, p. 27-42, 2004.

AMARAL, R. R. et al. Terapia fotodinâmica na endodontia—revisão de literatura. **Revista de Odontologia**, v. 15, n. 2, p. 207–211, 2010.

ARGUDÍN, M. A. et al. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1751-1773, 2010.

BAE, T. et al. *Staphylococcus aureus* virulence genes identified by bursa aurealis mutagenesis and nematode killing. **Proceedings of the national Academy of Sciences**, v. 101, n. 33, p.12312-12317, 2004.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. 2013, 51f. Dissertação (mestrado). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Lisboa, 2013.

BARCIA, J. J. The Giemsa stain: its history and applications. **International Journal of Surgical Pathology**, v. 3, p. 292-296, 2007.

BAROLET, D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. **Seminars Cutaneous Medicine Surgery Journal**, v. 27, p. 227-238, 2008.

BASTOS, V. M. P. et al. Comparação da incidência, da prevalência da colonização, e da resistência de *Staphylococcus aureus* em diferentes populações humanas. **Revista UNIABEU**. v. 6, n. 13, p. 28-40, 2013.

BENENSON, A. S. Control of Communicable Diseases Manual. **American Public Health Association**. v. 16, p. 184 – 187, 1995.

BIEL, M. A. et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy Treatment of Chronic Recurrent Sinusitis Biofilms. **National Institutes of Health**, Minnesota, p. 329-334, 2011.

BONNEAU, S. et al. Dynamics of pH-dependent self-association and membrane binding of a dicarboxylic porphyrin: a study with small unilamellar vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 87-96, 2004.

BRAID, J. J.; WALE, C. J. M. The antibacterial activity of triclosan-impregnated storage boxes against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, and *Shewanella putrefaciens* in conditions simulating domestic use. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 87-94, 2002.

BROOK, I.; FRAZIER, E. H. Aerobic and anaerobic microbiology of surgical-site infection following spinal fusion. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 841-843, 1999.

CASSIDY, C. M.; et al. Effect of sub-lethal challenge with photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) on the antibiotic susceptibility of clinical bacterial isolates. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**. p. 62-66, 2010.

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 629-641, 2009.

CLSI, **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standards-6^a ed. Document M&-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.

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>. Acesso em: 22 de setembro de 2015.

CUNDERLIKOVA, B.; GANGESKAR, L.; MOAN, J. Acid-base properties of chlorin e₆: relation to cellular uptake. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 53, p. 81-90, 1999.

DAI, T. et al. Photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a mouse skin abrasion model. **Lasers Surgery and Medicine**, v. 42, n. 2, p. 38-44, 2010.

DAVID, M. Z.; DAUM, R. S. Community -associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 616-687, 2010.

DEMINOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R.; **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 6, p. 2329-2335, 2005.

DENIS, T. G. et al. All you need is light: Antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. **Landes Bioscience**, Boston, p. 509-520, 2011a.

DENIS, T. G. et al. Analysis of the Bacterial Heat Shock response to Photodynamic Therapy-Mediated Oxidative Stress. **National Institutes of Health**, Boston, p. 707-713, 2011b .

DENYER, S. P.; MAILLARD, J. Y. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. **Symposium Series Society Applied Microbiology**, v. 31, p. 35S-45S, 2002.

DZIDIC, S., SUSKOVIC, J., KOS, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology Biotechnology**. v. 11, p. 11-21, 2008.

FEDERICO, M.L. *et al.* Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by proflavine -polylysine conjugates. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 1, p. 468-470, 2002.

FELDMAN, Bianca Calil. **Avaliação Clínica dos Efeitos da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no Tratamento não- cirúrgico da Periodontite Crônica**. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado). Universidade do Grande Rio. Programa de pós graduação em Odontologia, Duque de Caxias, 2009.

FERREIRA, A. R. R. F. S. **Clorinas e bacterioclorina fundidas com anel 4,5,6,7-tetra-hidropirazolo [1,5-a] piridina como novos fotossensibilizadores para o tratamento do cancro**. 2015, 110f. Dissertação (Mestrado). Universidade de Coimbra. Programa de pós-graduação em Química Medicinal, Coimbra, 2015.

FERRO S, et al. Efficient photoinactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a novel porphyrin incorporated into a poly-cationic liposome. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 5, p. 1026-34, 2007.

FIEDOR, L.; Stasiek, M.; MYSILIWA-KURDZIEL, B.; STRZALKA, K. Phytol as one of the Determinants of Chlorophyll Interactions in Solution. **Photosynthesis Research**, v. 78, p. 47-57, 2003.

FLEISCHER, B. 100 years ago: Giemsa's solution for staining of plasmodia. **Tropical Medicine and International Health**, v. 9, p. 755-756, 2004.

FILHO, J. R. F.; FREITAS, J. J. R.; SILVA, L. P. Investigando cinza da casca do arroz como fase estacionária em cromatografia: uma proposta de aula experimental nos cursos de graduação. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 416 - 419, 2012.

FONTANA, CR, *et al.* The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. **Journal Periodontol**; v. 44, n. 6, p. 751-759, 2009

FOXMAN, B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. **American Journal of Medicine**, v. 113, n. 1, p. 5-13, 2002.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Atheneu: São Paulo, p. 182, 2008.

FREMAUX, B.; PRIGENT -COMBARET, C.; VERNOZY - ROZAND, C. Long -term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: an updated review. **Veterinary Microbiology**, v. 132, n. 1-2, p. 1-18, 2008.

GARCIA-LOPEZ, P. *et al.* The discovery of dendritic spines by Cajal in 1888 and its relevance in the present neuroscience. **Progress in Neurobiology**, v. 83, p. 110-130, 2007.

GEORGE, S.; HAMBLIN, M.R.; KISHEN, A. Uptake pathways of anionid and cationic photosensitizers into bacteria. **Photochemical and Photobiology Sciences**, v. 8, n. 6, p. 788-795, 2009.

GEROLA, A. P. *et al.* Estudos quimiométricos da pheo formulada em pluronics®: ação fotodinâmica sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 97-101, 2013.

GEROLA, A. P. *et al.* Effects of metal and the phetyl chain on chlorophyll derivatives: physicochemical evaluation for photodynamic inactivation of microorganisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 4, p. 884-894, 2011.

GEROLA, A. P. **Estudos físico-químicos de derivados de clorofila em sistemas homogêneos e micro-heterogêneos: Aspectos fotofísicos, fotodinâmicos e fotoinativantes sobre microrganismos.** 2010, 124f. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Maringá. Programa de pós-graduação em Química, Maringá, 2010.

GIANSANTE, S. **Determinação da atividade fotodinâmica antimicrobiana de derivados porfirínicos.** 2014, 100f. Dissertação (Mestrado). Universidade Camilo Castelo Branco, Instituto de Engenharia Biomédica. Programa de pós-graduação de Bioengenharia, São José dos campos, 2014.

GILBERT, A.; BAGGOTT, J. **Essentials of Molecular Photochemistry, Blackwell Scientific Publications,** Oxford, 1991.

GROSSWEINER, L. I. Photodynamic therapy. **Journal of Laser Applications.** , v. 7, p. 51-57, 1995.

GRUNDMANN, H. et al. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. **PloS Medicine**, v.. 7, n. 1, 2009.

GURGEL, C. V. **Ação da clorofila como fotossensibilizador e do LED como fonte de luz alternativa na terapia fotodinâmica antimicrobiana contra o *Enterococcus faecalis*.** 2013, 125f. Tese (Doutorado). Faculdade de odontologia de Bauru. Programa de pós-graduação de ciências odontológica aplicada, Bauru, 2013.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T.; Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease **Photochemical and Photobioly Sciences**, v. 3, p. 436, 2004.

HANCOCK, R.E.W. Alterations in outer membrane permeability. **Annual Review of Microbiology**, v. 38, p. 237-264, 1984.

HARRIS F. et al. An investigation into the potential of phenothiazinium-based photosensitisers to act as PDT agents. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, p. 231-239, 2004.

HARVEY, B. H. et al. Role of monoamine oxidase, nitric oxide synthase and regional brain monoamines in the antidepressant-like effects of methylene blue and selected structural analogues. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, p. 1580 - 1591, 2010.

HAYEK, R. R. A. et al. **Comparison between photodynamic therapy and a bactericidal solution in the treatment of alveolitis microbiological evaluation.** Brazilian Dental Journal. Ribeirão Preto, v. 15. p. 110 - 110, 2004.

HAWKEY, P. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. **British Medical Journal.** v. 317, p. 657-359, 1998.

HOLMBERG, S. D. et al. Drug-resistant Salmonella from animals fed antimicrobials. **The New England Journal of Medicine,** p. 617-622, 1984.

HOWDEN, B. P.; DAVIES, J. K.; JOHNSON, P. D. R.; STINEAR, T. P.; GRAYSON, M. L. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. **Clinical Microbiology Reviews,** v. 23, n. 1, p. 99-139, 2010.

JORGE, A. O. C. Conceitos básicos e introdução ao estudo da microbiologia. **Microbiologia e Imunologia Oral,** 1^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012a. p. 3-11.

JORGE, A. O. C. Estafilococos. **Microbiologia e Imunologia Oral.** 1^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p 103-110, 2012.

JORI, G, F. C. et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers Surgery Medicine,** v. 38, n. 5, p. 468-481, 2006

JORI, G. Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology,** v. 36, p. 87-93, 1996.

KAHLMETER, G. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v.51, p. 69–76, 2003.

KHARKWAL, G. B. et al. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical applications. **National Institutes Of Health.** Boston: p. 755 -767, 2011.

KONOPLA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **Journal of Dental Research,** v. 86, p. 694-707, 2007.

LAMBERT, P. A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 31, p. 46-54, 2002.

LANFER-MARQUEZ, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 3, p. 227-242, 2003.

LAW, R. J. et al. In vitro and in vivo model systems for studying enteropathogenic *Escherichia coli* infections. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 3, 2013.

LEE, et al. Chlorophyll derivatives (CpD) extracted from silk worm excreta are specifically cytotoxic to tumor cells in vitro. **Yonsei Medical Journal**, v. 31, n. 3, p. 225-233, 1990.

LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. Porto Alegre: Artmed, 2010, 10 ed., 664 p.

LIMANTARA, L. et al. Photostability of Bacteriochlorophyll a and derivatives: potential sensitizers for photodynamic tumor therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, p. 770-780, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa, SP, 2002.

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

MAESTRIN, A. P. J. et al. Extração e purificação de clorofila *a*, da alga *Spirulina maxima*: um experimento para os cursos de química. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1670 - 1672, 2009.

MALMSTEN, M. Surfactants and Polymers in Drug Delivery. **Institute for Surface Chemistry and Royal Institute of Technology Stockholm**. New York, 2002.

McGOWAN Jr, J. E. Minimizing antimicrobial resistance: The key role of the infectious diseases Physician. **Clinical Infectious Disease**, v. 38, p. 939-942, 2004.

MONTEIRO, J. S. C. et al. Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy on *staphylococcus aureus* using phenothiazinium dye with red laser. **Proceedings of the International Society for Optics and Photonics**, v. 9309, p. 93090X-1, 2014.

MOORE, W. J. **Físico-química**. São Paulo: Editora Edgard Blocher, v. 2, 4 ed., 1976.

MOURA, E. **Reduzindo risco de infecção de sítio cirúrgico por *Staphylococcus aureus***. Disponível em: <http://blog.pebmed.com.br/2015/06/08/reduzindo-risco-de-infeccao-de-sitio-cirurgico-por-staphylococcus-aureus/>. Acesso em: 25 de Novembro de 2015

MURRAY, P. R. et al. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 5 ed., 2006

NIEMZ, M. H. **Laser- Tissue Interactions: Fundamentals and Applications**. 3ed. Ed. New York: Springer, 2007.

OLIVEIRA, A. A. M. et al. **Colorações usuais em hematologia - Colorações Panóticas ou Colorações segundo Romaniwsky**. Disponível em: [<http://docslide.com.br/documents/><coloracoes-usuais-em-hematologia.html>](http://docslide.com.br/documents/<coloracoes-usuais-em-hematologia.html>). Acesso em: 15 de novembro de 2015.

OLIVEIRA, B. P. et al . In vitro antimicrobial photoinactivation with methylene blue in different microorganisms. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, Piracicaba, v. 13, n. 1, p. 53-57, 2014.

OLSVIK, O. et al. Pathogenic *Escherichia coli* found in food. **International Journal Food Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 103-113, 1991.

OSTROSKY, Elissa A. et al . Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PARK, Y. J. et al. Chlorophyll derivatives – A new photosensitizer for photodynamic therapy of cancer in mice. **Yonsel Medical Journal**, v. 30, p. 212-218, 1989.

PARUSSOLO, P. **Coloração de Gram**. Disponível em: http://magicnumbers-parussolo.blogspot.com.br/2011_06_01_archive.html. Acesso em 22 de setembro de 2015.

PATERSON, D. L.; YU, V. L. Extended spectrum beta-lactamases: a call for improved detection and control. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p. 1419-1422, 1999.

PELOI, L. S. et al. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **Journal of Bioscience**, v. 33, n. 2, p. 231-237, 2008.

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

PRATES, R.A. **Verde de malaquita como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica: ação bacteriana sobre actinomycescomitans um estudo in vitro. 2005, 49f.** Dissertação (mestrado). Faculdade de Odontologia de São Paulo, Universidade de São Paulo. Programa de pós-graduação do Instituto de pesquisas energéticas nucleares, São Paulo 2005.

PREVIDELLO, B. A. et al. O pKa de indicadores ácido-base e os efeitos de sistemas coloidais. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 600-606, 2006.

RAAB, O. Uber die wirkung fluorizierender stoffe aif Infusorien. **Zeitung Biologic**, v. 39; p. 524-46, 1900.

RAGHAVENDRA, M. et al. Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics. **Australian Dental Journal**, v. 54, n. 4, p. 102-109, 2009.

RAJESH, S. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. **Journal of Indian Society of Periodontology**, p. 323-327, 2012.

RICE, L.; B. R. Genetic and Biochemical Mechanisms of Bacterial. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Nova Iorque, 5ª ed., p. 441-476, 2005 .

REACHER, M. H. et al. Bacteraemia and antibiotic resistance of its pathogens reported in England and Wales between 1990 and 1998: trend analysis. **British Medical Journal**, v. 320, p. 213-216, 2000.

ROGERS, B. A. et al. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community - associated strain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 1, p. 1- 14, 2011.

RONSEIN, G. E. et al. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismo de fano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 563-568, 2006.

RYSKOVA L. et al. Photodynamic antimicrobial therapy. **Central European Journal of Biology**, v. 5, p. 400-406, 2010.

SANTOS, R. O. MENEZES, H. D.; OLIVEIRA, C. A. Avaliação preliminar da inativação fotodinâmica de *Escherichia coli* utilizando extrato de *Bidens Sulphurea* e *Tagetes Rerecta*. **Horizonte Científico**, v. 1, p. 1-8, 2009.

SCHIRMER, R. H. et al. Lest we forget you methylene blue. **Neurobiology of Aging**, v. 32, p. 2325–2325, 2011.

SILVA, V. L. Morfologia e citologia da célula bacteriana. Universidade Federal de Juiz de Fora, 2013. Disponível em: <http://www.ufjf.br/microbiologia/files/2013/05/Morfologia-e-Citologia-da-c%C3%A9lula-bacteriana3.pdf>. Acesso em: 20 de outubro de 2015.

SEVERINO D. et al. S. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. **Photochemistry Photobiology**. v. 77, n. 5, p. 459-468, 2003.

SHARIFF, V. A. A. R. et al. 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.

SHARMAN, W. M. et al. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Drug Discovery Today**, v. 4, p. 507-517, 1999.

SILVA, M. P. **Terapia fotodinâmica em esporos de bacillus atrophaeus e bacillus subtilis: estudos com LASER, LED, azul de metileno, rosa bengala e verde malaquita**. 2012, 104 f. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. Programa de pós-graduação em Biopatologia Bucal, São José dos Campos, 2012.

SIMPSON, B. B. et al. **Economic Importance of Compositae**. In compositae. Vienna: International Association for Plant Taxonomy. Vienna, 2009.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, p. 801-807, 2002.

SOARES, L. B. **A constituição química do óleo essencial de folhas, atividade fungicida e acaricida de artemisia vulgaris L. e potencial aplicação na avicultura industrial**. 2012, 90 f. Dissertação (mestrado). Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo, 2012.

SOARES, R. R. S. S. **Estudo de propriedades da clorofila a e da feofitina a visando à Terapia fotodinâmica.** 2006, 92 f. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Maringá. Programa de pós-graduação em Química Maringá (PR): Faculdade de Química, Maringá, 2006.

SOUKOS, N. S.; GOODSON, J. M. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. **Periodontol** 2000, v. 55, n. 1, p. 143-166, 2011.

STARK, G. Functional consequences of oxidative membrane damage. **Journal of Membrane Biology**, v. 205, p.1-16, 2005.

TAKAHASHI, S.; TANAKA, T.; ASHIKI, A. Clinical studies of methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) infections during the recent 10 months in our department. **Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi**, v. 81, n. 10, p. 1480-1486, 1990.

TARDIVO, J. P. et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, p. 175-191, 2005.

TAVARES, A. et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance After Treatment. **Marine Drugs**, Portugal: p. 91-105, 2010.

TAVARES, W. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TENOVER, F. C. et al. Detection and reporting of organisms producing extended –spectrum beta –lactamases: survey of laboratories in Connecticut. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 4065-4070, 1999.

TODAR, K. **Bacterial Resistance to Antibiotics.** Todar's Online Textbook of Bacteriology. Disponível em: http://textbookofbacteriology.net/resantimicrobial_3.html. Acesso em: 10 de Novembro de 2015.

TORTORA, G. et al. **Microbiologia.** Porto Alegre: Artmed, 2010.

TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia.** 5. ed. São Paulo: Atheneu, p. 760, 2008.

USACHEVA, M. N. et al. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 29, n. 2, p. 165-73, 2001.

VAN HAL, S. J. et al. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Clinical Microbiology Reviews.**, v. 25, n. 2, p. 362-386, 2012.

VAZQUEZ, F. et al. Survey of *Escherichia coli* septicemia over a six -year period. **European Journal of Clinical Microbiol and Infectious Diseases**, v. 11, p.110–117, 1992.

VEIGA. C. L. **Os antibióticos na prática clínica**. Lisboa: Infecon, 1984.

VON TAPPEINER, H.; JESIONEK, A. Therapeutische versuche mit fluoreszierenden Stoffen. **Münchener medizinische Wochenschrift**, v. 47, p. 2042-2044, 1903.

WAGNER, S. J. et al. Factors affecting virus photoinactivation by a series of phenothiazine dyes. **Photochemistry e Photobiology**, v. 67, n. 3, p. 343-349, 1998

WAINWRIGHT M. Phenotiazinium photosensitisers: V. Photobactericidal activities of chromophore-methylated phenotiazinium salts. **Dyes and Pigments**. n. 73, p. 7-12, 2007.

WAINWRIGHT, M. The development of phenothiazinium photosensitisers. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, p. 263-272, 2005.

WAINWRIGHT, M. The emerging chemistry of blood product disinfection. **Chemical Society Reviews**, v. 31, p. 128–136, 2002.

WAINWRIGHT M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 13-28, 1998.

WATERBEEMD, H. Physico-chemical Approaches to Drug Absorption. In: **Drug bioavailability estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability**. Edited for Waterbeemd, H. Lennernas, H. e Artursson, P. WILEY, Weinheim, p. 3-14, 2004.