

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

CYNTHIA SUZYELLEN ALBUQUERQUE CAIRES

AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA EM BACTÉRIAS
MULTIRRESISTENTES

CYNTHIA SUZYELLEN ALBUQUERQUE CAIRES

AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA EM BACTÉRIAS
MULTIRRESISTENTES

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

CYNTHIA SUZYELLEN ALBUQUERQUE CAIRES

AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA EM BACTÉRIAS
MULTIRRESISTENTES

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

Resultado_____

Campo Grande-MS, _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Valter Aragão do Nascimento

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

Prof^o. Dr. Eduardo José de Arruda

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

Prof^a. Dr^a. Marilene Rodrigues Chang

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

Prof^a. Dr^a. Carla Santos de Oliveira

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

Prof^o. Dr. Gustavo Nicolodelli

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Dedico este trabalho a minha família, vocês são a fonte de toda minha força e inspiração, amo vocês.

Agradecimentos

Ao meu marido Anderson Rodrigues Lima Caires, muito obrigada por partilhar deste sonho comigo, seria impossível chegar até aqui sem você, obrigada por suportar minhas crises e me fazer sorrir até nos momentos de desespero.

As minhas filhas Sophia Albuquerque Lima Caires e Livia Albuquerque Lima Caires, que um dia vocês possam entender que toda correria e as vezes ausência, e se orgulhar dessa minha conquista, pois ela também é de vocês.

A minha família, meus avós Messias Gonçalves e Edna Nunes Gonçalves, minha mãe Isabel Cristina Gonçalves de Paulo, meu irmão Braulio H. Albuquerque, e minha sogra Valdecilva, obrigada pela torcida, esta vitória também é nossa.

Um agradecimento especial as amigas e companheiras do grupo PDT Alessandra Ramos Lima, Cicera Maria da Silva e Thalita H. Lima, que me apoiaram durante toda minha trajetória no laboratório, ajudando, aconselhando, vocês fizeram com que tudo fosse mais leve e divertido.

A todos do Grupo de óptica e fotônica (GOF) que me receberam tão bem, obrigada pela acolhida, e meu muito obrigada a todos que de alguma maneira participaram deste projeto.

Ao Prof^o Valter Aragão do Nascimento, por propiciar as condições necessárias para que esse projeto tivesse continuidade, obrigada pela confiança.

A Prof^a Cassia R. B. Leal pela ajuda no início deste trabalho, muito obrigada pelos ensinamentos, fundamentais para realização deste projeto.

A Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, ao programa de pós-graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste que e a CAPES por todo o suporte durante esses 4 anos de doutorado.

A minha supervisora durante meu sanduiche na University of Essex em Colchester Prof^a Corinne Whitby, e ao Prof^o Ian Colbeck, muito obrigada pela acolhida, e por todo suporte e confiança.

A minha grande amiga Stephanie Jones e a sua família, que deixou a nossa vida em Colchester muito mais leve e acolhedora, muito obrigada por nos fazer sentir parte da família nesse período que passamos por esta cidade maravilhosa.

Aos grandes amigos Cynthia e Ricardo, obrigada por toda ajuda durante a nossa mudança para Colchester, e por nos fazer sentir em casa estando tão longe do Brasil nos nossos encontros.

RESUMO

Devido o crescente surgimento de bactérias multirresistentes a antibióticos, o desenvolvimento de novas tecnologias se faz necessário para possibilitar a inativação das superbactérias. O objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicabilidade e eficácia do processo de inativação fotodinâmica (IFD), por meio do uso dos fotossensibilizadores (FSs) Eosina Azul de Metileno (GIEMSA) e a clorofilina cúprica de sódio (E-141ii), contra bactérias susceptíveis *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923, *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922 e multirresistentes à antibióticos *S. aureus* MRSA (Genbank Mh087437) e *E. coli mcr-1* (CCBH 23593). Os bioensaios de IFD foram realizados submetendo as cepas à diferentes concentrações de FSs (0,0, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 e 20,0 μM) para a *S. aureus* e (0,0, 5,0, 10,0, 20,0, 40,0 e 50,0 μM) para *E. coli*. Após a incubação dos FSs, as amostras foram divididas em dois grupos, um mantido no escuro e outro submetido à iluminação. A inativação bacteriana foi determinada após 18 h de incubação, a 37 °C, pela contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). Os resultados demonstraram que o FS GIEMSA foi eficaz para fotoinativar tanto as cepas *S. aureus* ATCC quanto a *S. aureus* MRSA. Além disso, apresentou também eficácia contra a *E. coli* ATCC e *E. coli mcr-1* quando submetidas a irradiação de luz vermelha (625 nm). O FS GIEMSA possibilitou 100% de inibição do crescimento de *E. coli* positiva para *mcr-1* na concentração de 10 μM e quando submetida a dose de energia de 45 J cm^{-2} . Já para a *S. aureus* ATCC e *S. aureus* MRSA, 100% de inibição do crescimento bacteriano foi obtido na concentração de GIEMSA acima de 10 μM quando irradiado pela luz vermelha à 30 J cm^{-2} . Os resultados também mostraram que a E-141ii pode ser aplicada como um FS efetivo para fotoinativação em *S. aureus* ATCC e *S. aureus* MRSA, nossos achados demonstram que o crescimento bacteriano foi completamente inibido em concentrações acima de 5 μM de FS para *S. aureus* (ATCC) e acima de 10 μM para *S. aureus* (MRSA) quando irradiado pela luz vermelha usando uma dose de 30 J cm^{-2} . Determinou-se também o coeficiente de partição dos FSs para aferir suas afinidades por membranas celulares, e como resultado ambos demonstram que os FSs apresentaram afinidade. Adicionalmente, os mecanismos de toxicidade do processo de IFD foi avaliado a partir da determinação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) pelos FSs quando submetidos a irradiação luminosa. Os resultados mostraram que o FS GIEMSA foi capaz de induzir a IFD por meio da geração de EROs (mecanismo Tipo I) e $^1\text{O}_2$ (mecanismo Tipo II). Diferentemente, a E141ii apenas apresentou o mecanismo Tipo I.

Em resumo, o presente estudo demonstrou que o FS GIEMSA pode ser aplicado com sucesso para fotoinativação de bactérias *E. coli* resistentes e susceptíveis à colistina (*mcr-1* positiva) e *S. aureus* resistentes e susceptíveis à meticilina (MRSA), bem como a E-141ii pode ser efetivamente usado para a IFD de bactérias *S. aureus* resistentes e susceptíveis à meticilina (MRSA).

Palavras chaves: Inativação fotodinâmica. Bactérias multirresistentes. Giemsa. E141ii.

ABSTRACT

The growing number of antibiotic-resistant bacteria is emerging, which the development of new technology is needed to kill multi-resistant bacteria. The present work aimed to evaluate the photodynamic inactivation (PDI) by using eosin methylene blue (GIEMSA) and sodium copper chlorophyllin (E-141ii) as photosensitizer (PS) agents against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923 and *S. aureus* MRSA (Genbank accession number Mh087437), as well as against non-resistant *E. coli* strain (ATCC 25922) and a *mcr-1* positive *E. coli* strain (CCBH 23593) under light doses in the 30-45 J.cm⁻² range provided by a LED device emitting at 625 nm. The PDI experiments were performed using the strains in which five PS concentrations (0.0, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 and 20.0 µM) for *S. aureus*, and (0.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 e 50.0 µM) for *E. coli*. After PS incubation, the samples were divided in two groups, one kept in the dark and another submitted to illumination. Then, the bacterial inactivation was determined 18 h after the incubation at 37 °C by counting the colony-forming units (CFU). The results demonstrated that GIEMSA is effective against *S. aureus* ATCC and *S. aureus* MRSA and also against *mcr-1* positive *E. coli* strain. Similarly to the non-resistant strain, multi-resistant strain was susceptible to the photoinactivation under red light irradiation using GIEMSA as photosensitizer. The GIEMSA promoted 100% of growth inhibition of *mcr-1* positive *E. coli* using a low PS concentration (10 µM) when illuminated at 625 nm with an energy dose of 45 J cm⁻², and for *S. aureus* ATCC and *S. aureus* MRSA 100% of growth inhibition over 10 µM when irradiated by red light using a dose of 30 J cm⁻². The results also showed that E-141ii can be applied as an effective PS for photoinactivation of *S. aureus* ATCC and *S. aureus* MRSA. The results revealed that the bacterial growth was completely inhibited at concentrations over 5 µM of PS for *S. aureus* (MSSA) and over 10 µM of PS for *S. aureus* (MRSA) when irradiated by red light at 30 J cm⁻². The present study also evaluated the PS's membrane affinity by partition coefficient, which the data demonstrated that both PSs revealed to have membrane affinity. Additionally, the toxicity mechanisms of the IFD process were evaluated by determining the production of reactive oxygen species (ROS) and singlet oxygen (¹O₂) by the PSs when subjected to light irradiation. It was observed that the GIEMSA produces both type I and type II mechanisms, generating ROS and ¹O₂, while E-141ii only produces ROS. In summary, the present findings showed that GIEMSA could be successfully applied as a PS for inactivation of colistin-resistant *E. coli* (*mcr-1* positive) and non-multidrug resistant *E. coli*, *S. aureus* methicillin resistant and sensitive, while E-141ii has a great potential for PDI application against methicillin-resistant and sensitive *S. aureus* strains.

Keywords: Photoinactivation. Giemsa. E141ii. Multidrug-resistant bacteria.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA	5-ácido aminolevulínico
AM	Azul de Metileno
ATO	Azul de Toluidina
ATCC	Coleção de microorganismos Norte Americana, do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Caldo cérebro coração, do inglês <i>Brain Heart Infusion Broth</i>
CI	Cruzamento Intersistema
DHE	Dihydroethidium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPBF	Diphenylisobenzofuran
E-141ii	Clorofilina Cúprica de sódio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FS	Fotossensibilizador
GIEMSA	Eosina Azul de Metileno segundo Giemsa
HpD	Hematoporfirina derivativa
IFD	Inativação fotodinâmica
LDE	Diodo emissor de luz do inglês <i>Light Emitting Diode</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
PDI	Do inglês photodynamic inactivation
RGB	Vermelho/Verde/Azul do inglês <i>Red/Green/Blue</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio do inglês <i>reactive oxygen species</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde do inglês <i>World Health Organization (WHO)</i>
PDT	Terapia Fotodinâmica do inglês <i>photodynamic therapy</i>
TFD	Terapia fotodinâmica
UV-Vis	Ultravioleta-visível
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

VRSA

S. aureus resistente à vancomicina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
cm	Centímetros
C+	Controle Positivo
e ⁻	Eletron
h	Hora
J/cm ²	Joules/ centímetro quadrado
mW	Miliwatts
mWcm ⁻²	MiliWatts por centímetro quadrado
Na	Sódio
O ₂	Oxigênio molecular
³ O ₂	Oxigênio tripleto
¹ O ₂	Oxigênio singlete
•O ₂ ⁻	Superóxido
•OH	Radical hidroxila
μL	Microlitros
μm	Micrômetros
μM	Micromolar
%	Porcentagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferenças estruturais da parede das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	19
Figura 2 - Linha do tempo demonstrando a inserção dos antibióticos e o aparecimento de resistência.....	24
Figura 3 - Principais mecanismos de resistência bacteriana.....	25
Figura 4 - Diagrama de Jablonski simplificado.....	27
Figura 5 - Espectro da radiação eletromagnética e sua penetração nos tecidos.....	28
Figura 6 - Diferença entre a atuação dos antibióticos e dos fotossensibilizadores nas bactérias.....	30
Figura 7 - Evolução dos antibióticos e fotossensibilizadores.....	32
Figura 8 - Estrutura químicas dos fenotiazínicos mais utilizados em PDI.....	33
Figura 9 - Absorbância e fórmula química do Giemsa.....	35
Figura 10 - Estrutura química das porfirinas e clorinas.....	36
Figura 11 - Espectro de absorção e estrutura química da clorofilina cúprica de sódio.....	37
Figura 12 - Unidades formadoras de colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC em função da concentração de E-141ii.....	45
Figura 13 - Unidades formadoras de colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA em função da concentração de E-141ii.....	46
Figura 14 - Imagem das placas de Petri contendo as unidades formadoras de colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC para as diferentes concentrações de E-141ii.....	47
Figura 15 - Imagem das placas de Petri contendo as unidades formadoras de colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA para as diferentes concentrações de E-141ii.....	48
Figura 16 - Unidades formadoras de colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC em função da concentração de Giemsa.....	49
Figura 17 - Unidades formadoras de colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA em função da concentração de Giemsa.....	50
Figura 18 - Imagem das placas de Petri contendo as unidades formadoras de colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC para as diferentes concentrações de Giemsa.....	51
Figura 19 - Imagem das placas de Petri contendo as unidades formadoras de colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA para as diferentes concentrações de Giemsa.....	52

Figura 20 - Unidades formadoras de colônias de <i>Escherichia coli</i> ATCC em função da concentração de Giemsa.....	53
Figura 21 - Unidades formadoras de colônias de <i>Escherichia coli mcr-1</i> positiva em função da concentração de Giemsa.....	54
Figura 22 - Imagem das placas de Petri das UFC de <i>Escherichia coli</i> ATCC.....	55
Figura 23 - Imagem das placas de Petri das UFC de <i>Escherichia coli mcr-1</i> positiva.....	56
Figura 24 - Curva de calibração da E-141ii para o cálculo de coeficiente de partição.....	57
Figura 25 - Absorbância em 407 nm em função da concentração de E-141ii em n-Butanol.....	58
Figura 26 - Separação de fases água/n-Butanol utilizando E-141ii.....	59
Figura 27 - Absorbância da E-141ii em n-Butanol após o experimento de partição.....	59
Figura 28 - Curva de calibração do Giemsa para o cálculo de coeficiente de partição.....	60
Figura 29 - Absorbância na banda 528 nm em função da concentração de Giemsa.....	61
Figura 30 - Separação de fases água/n-Butanol utilizando Giemsa.....	62
Figura 31 - Concentração de Giemsa no n-Butanol.....	62
Figura 32 - Absorbância do Giemsa e DPBF em função do tempo.....	63
Figura 33 - Absorbância do Giemsa em 415 nm em função do tempo.....	64
Figura 34 - Fluorescência do Giemsa e DHE em função do tempo.....	65
Figura 35 - Aumento da intensidade de fluorescência em função do tempo promovido pelo Giemsa quando submetido a luz vermelha (610 nm) em função do tempo.....	65
Figura 36 - Fluorescência da E-141ii e DHE em função do tempo.....	66
Figura 37 - Fluorescência da E-141ii em 610 nm em função do tempo.....	67
Figura 38 - Absorbância do E-141ii e DPBF em função do tempo.....	67
Figura 39 - Imagem <i>S. aureus</i> utilizando FS Giemsa.....	68
Figura 40 - Imagem de <i>E. coli</i> utilizando FS Giemsa.....	69
Figura 41 - Imagem de <i>S. aureus</i> utilizando FS E141ii.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais classes, alvos e mecanismos de ação de classes dos antibióticos.....	22
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Bactérias	18
2.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	20
2.1.2 <i>Escherichia coli</i>	21
2.1.3 <u>Mecanismo de ação dos antibióticos</u>	22
2.1.4 <u>Mecanismos de resistência bacteriana</u>	23
2.3 Princípios da terapia fotodinâmica	26
2.3.1 <u>Resistência a IFD</u>	28
2.3.2 <u>Fotossensibilizadores</u>	31
2.3.3 <u>Fenotiazinas</u>	33
2.3.3.1 Eosina azul de metileno segundo Giemsa.....	33
2.3.4 <u>Clorinas</u>	35
2.3.4.1 Clorofilina cúprica de sódio.....	36
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo Geral	39
3.2 Objetivos Específicos	39
4 METODOLOGIA	39
4.1 Equipamentos	39
4.1.1 <u>Sistema LED</u>	39
4.2 Fotossensibilizador	39
4.2.1 <u>Preparação dos fotossensibilizadores</u>	39
4.3 Bactérias	39
4.3.1 <u>Ensaio Biológicos <i>in vitro</i></u>	40
4.3.2 <u>Determinação da inibição do crescimento bacteriano</u>	40
4.3.3 <u>Análise estatística dos testes de inibição bacteriana</u>	41
4.4 Determinação do coeficiente de partição no sistema bifásico Água/N-butanol	41
4.5 Caracterização da produção de espécies reativas de ox (EROs)	
4.6 Preparação das amostras para microscópio eletrônico de varredura (MEV)	43
5 RESULTADOS	45

5.1 Inibição do crescimento bacteriano.....	45
5.2 Coeficiente de partição.....	57
5.2.1 Coeficiente de partição E-141ii.....	57
5.2.1 Coeficiente de partição Giemsa.....	57
5.3 Determinação da Produção de EROs.....	63
5.3.1 Geração de EROs pelo Giemsa.....	63
5.3.2 Geração de EROs pela E141ii.....	66
5.4 MEV.....	68
5.4.1 Avaliação morfológica de <i>S. aureus</i> a IFD pelo Giemsa.....	68
5.4.2 Avaliação morfológica de <i>E. coli</i> a IFD pelo Giemsa.....	68
5.4.3 Avaliação morfológica de <i>S. aureus</i> submetidas a IFD pelo E141ii.....	69
6 DISCUSSÃO.....	70
7 CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

A introdução dos antibióticos promoveu uma grande transformação na medicina moderna, propiciando uma grande evolução em tratamentos complexos como quimioterapia e cirurgias. Entretanto, recentemente entramos em uma fase em que, para os pacientes infectados por bactérias multirresistentes, é como se voltássemos à era do pré-antibiótico (ARIAS; MURRAY, 2009; RUNCIE, 2015).

A resistência aos antibióticos se tornou um dos maiores problemas globais do século 21. O uso inapropriado e indiscriminado de antibióticos utilizados em ambulatórios, hospitais e na indústria alimentícia fez com que bactérias desenvolvessem resistência a várias classes de antibióticos, criando bactérias multirresistentes, assim torna-se difícil tratar as infecções corriqueiras (ALANIS, 2005).

A grande dificuldade de se curar infecções causadas por cepas de bactérias multirresistentes, como as resistentes a carbapênemicos, faz com que as opções de tratamento para esses patógenos sejam extremamente limitadas, forçando o uso de medicamentos que foram descartados anteriormente devido sua alta toxicidade (BOUCHER, 2009). Como exemplo, entre as bactérias resistentes a antibióticos temos *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Escherichia coli* ST131 e *Klebsiella* ST258. Estima-se que as pessoas infectadas pela MRSA têm 64% maior chance de morrer do que aquelas infectadas por MSSA (*Staphylococcus aureus* sensível à meticilina) (OMS, 2020). Outra dificuldade associada as bactérias multirresistente é o fato de atualmente as cepas poderem se disseminar mais facilmente para diferentes países devido ao aumento do comércio global e de viagens pelo mundo (LAXMINARAYAN, *et al.* 2013).

Em 2016 foi relatado pela primeira vez na China a existência de um gene de resistência em *Escherichia coli* (*E. coli*) resistente a colistina que é transmitido pelo plasmídeo, este gene de resistência foi denominado *mcr-1*. Vale a pena destacar que a colistina é um antibiótico de largo espectro, pertence à família das polimixinas, que está sendo utilizado como um dos últimos recursos em infecções hospitalares (LIU, *et al.*, 2016).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2020) a resistência da *E. coli* a fluoroquinolona, que é um antibiótico utilizado para tratamento de infecções por esta bactéria, já é muito comum em várias partes do mundo fazendo com que o tratamento seja ineficaz em mais da metade dos pacientes. Ainda segundo a OMS (2015) é urgente o desenvolvimento de novos tratamentos, sendo isso o ponto chave para um plano de ação global para a resistência antimicrobiana.

Neste sentido é importante realizar estudos que possam gerar alternativas de tratamento para infecções bacterianas, na qual uma promissora estratégia é a fototerapia (SPERANDIO, *et al.* 2013). A terapia fotodinâmica (TFD) é uma terapia principalmente utilizada contra o câncer, porém cada vez mais trabalhos vêm demonstrando seu potencial para eliminação de infecções bacterianas, e neste caso, é denominado de inativação fotodinâmica (IFD). A IFD consiste em aplicação de um fotossensibilizador combinado com irradiação luminosa na presença do oxigênio molecular (O₂) que promove a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que por sua vez induzem a morte celular (MENEZES, *et al.* 2007; PERUSSI, 2007).

Tendo em vista a resistência aos antimicrobianos convencionais, torna-se necessário o desenvolvimento de novos procedimentos para promover a inviabilização do crescimento de microorganismos multirresistentes. Neste sentido, a IFD é uma alternativa promissora no combate de infecções localizadas, onde sua principal vantagem é a ação multissítio que permite a inativação de bactérias resistentes a antibióticos. Estudo recente demonstrou o potencial dos FSs eosina azul de metileno segundo Giemsa (GIEMSA) e a clorofilina cúprica de sódio (E-141ii) na inativação fotodinâmica de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), assim como o GIEMSA que também se mostrou efetivo para *Escherichia coli* (ATCC 25922) (Caires, *et al.*, 2017). Todavia, a eficácia desses FSs no processo de IFD de bactérias resistentes a antibióticos ainda não foram testadas.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade fotoantimicrobiana do GIEMSA, como alternativa de FS para *Escherichia coli* portadora do gene *mcr-1* e *Staphylococcus aureus* MRSA, e da E-141ii na fotoinativação de *Staphylococcus aureus* MRSA a partir da IFD, e compará-las a inativação de cepas sensíveis a antibióticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

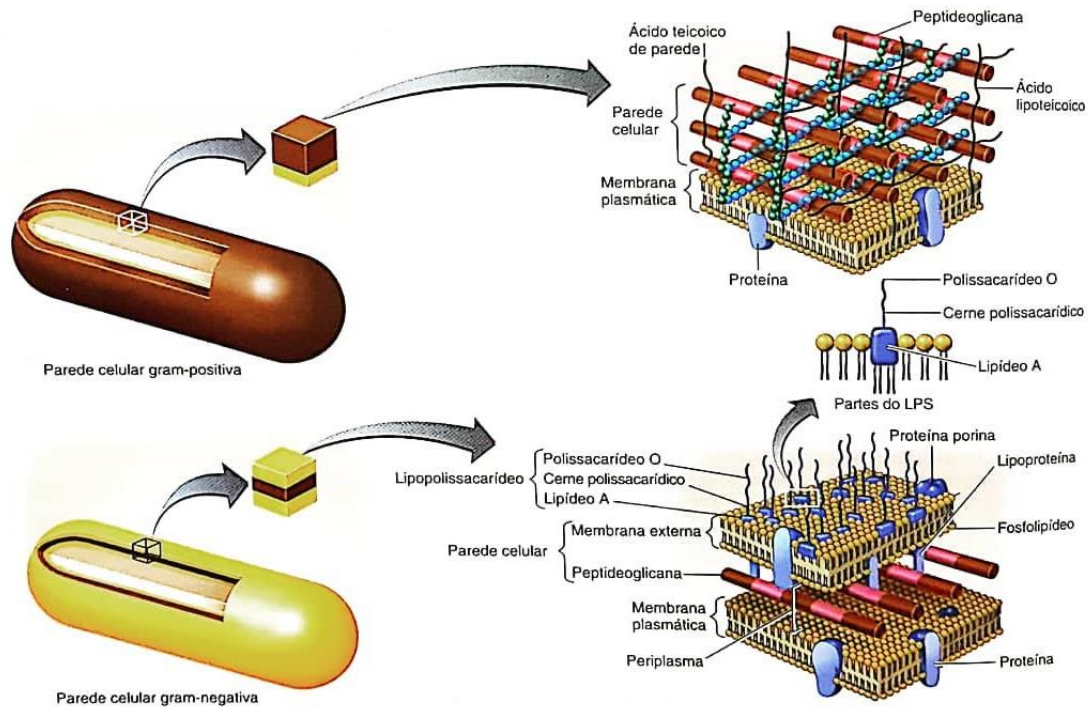
2.1 Bactérias

As bactérias são seres procariontes, unicelulares cujo material genético não é envolto por uma membrana nuclear (TORTORA *et al.*, 2012). Ao invés de apresentar núcleo, há uma região nuclear, sendo sua parte central constituída por DNA (Ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico). E no citoplasma se encontram os ribossomos, nucleóide e vacúolos (BLACK, 2013).

As bactérias podem ser classificadas quanto a sua forma, e assim serem divididas em cocos, bacilos e espiralos. Os cocos apresentam normalmente formato esférico, porém podem ser ovais ou mesmo achatados na extremidade. Durante a divisão celular, as células podem permanecer unidas aos pares e nesse caso são denominados diplococos. Quando agrupados em cadeias são chamados streptococos, arranjos de quatro células, tétrade; oito células em formato de cubo sarcinas e agrupados em cachos estafilococos (TORTORA *et al.*, 2012). Os bacilos se dividem somente no seu eixo menor e por isso apresentam menos arranjos que os cocos, podendo ser diplobacilos e estreptobacilo, há ainda aqueles parecidos a cocos, estes são chamados de cocobacilos (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008). As bactérias espiralados que se assemelham a bastões curvos são chamadas de vibriões, com formato helicoidal rígido espirilos, e os com forma helicoidal flexível espiroqueta (TORTORA *et al.*, 2012).

Uma outra maneira de classificar as bactérias consiste na sua capacidade de reter corantes, a coloração de Gram nos permite dividir as bactérias em dois grandes grupos, as Gram-positivas e Gram-negativas (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008). Esta coloração define os componentes e funções da parede celular. E assim é possível observar que a parede celular das bactérias Gram-negativas é mais complexa que as das Gram-positivas, tanto do ponto de vista químico, quanto estrutural, como mostra a Figura 1 (MURRAY, 2009).

Figura 1 - Diferenças estruturais da parede das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.



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

Apesar de sua camada mais espessa, as bactérias Gram-positivas apresentam apenas um tipo de macromolécula, cerca de 70% a 75% de sua parede é composta por peptidoglicano, mas além desta macromolécula encontramos proteínas e ácidos teicoicos. A parede das Gram-negativas é formada por poucas camadas de peptidoglicano e por uma membrana externa, estas estruturas são separadas pelo espaço periplasmático (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008). No espaço periplasmático é onde se encontram as enzimas degradativas e proteínas de ligação e transporte para vitaminas aminoácidos e íons (WINN, *et al.*, 2008).

As bactérias Gram-positivas apresentam uma membrana externa mais espessa e porosa de peptidoglicano interconectadas, e ácido teicoico em sua parede celular conferindo uma carga negativa, esses locais de ligação conseqüentemente tem uma maior afinidade para as moléculas catiônicas. Sabe-se que membrana externa das bactérias Gram-negativas é rica em lipopolissacarídeos e que estes possuem também carga negativa, assim sendo, possuem uma forte afinidade para cátions tais como cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}) (GEORGE; HAMBLIN; KISHENA, 2009).

As bactérias multiplicam-se rapidamente e possuem grande capacidade de mutação, mecanismo necessário para que sobrevivam na presença de antibióticos, tornando-as

predominante na população microbiana e levando a um aumento na incidência do número de bactérias patogênicas resistentes aos antibióticos (NEVES, *et al.*, 2011).

2.1.1 Staphylococcus aureus

A principal espécie do gênero *Staphylococcus*, é a *S. aureus*, caracterizadas como cocos Gram-positivos que tendem a ficar agrupados, catalase-positivos, não-esporulados e geralmente não-encapsulados. Ela faz parte da nossa microbiota normal, porém atua também como agente em diversos tipos de infecções (SANTOS, *et al.*, 2007; TRABULSI e ALTERTHUM, 2008). Este microrganismo faz parte da microbiota transitória da pele em humanos, podendo também ser encontrada nas fossas nasais em 20 % da população, e causar desde infecções simples como foliculite e furúnculos, a mais graves como pneumonia, meningite, endocardite e sepse (SANTOS, *et al.*, 2007).

A penicilina foi por muito tempo a droga de escolha para o tratamento de infecções contra a *S. aureus*. Todavia, seu uso iniciou-se nos anos 1930 e tão logo foi colocada no mercado, a *S. aureus* passou a desenvolver resistência a esse betalactâmico pela produção da betalactamase (penicilinase), capaz de hidrolisar o anel betalactâmico da penicilina. Em 1960 foi introduzida a meticilina (penicilina semissintética) que não era suscetível a betalactamase (SANTOS, *et al.*, 2007).

As linhagens com resistência a meticilina foram denominadas de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) e são resistentes a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos. O mecanismo de ação desses antimicrobianos beta-lactâmicos se dá ao se ligar a uma proteína que possui afinidade por eles envolvida na síntese da parede celular. Impedindo a formação da parede celular e provocando a lise da célula. No mecanismo de resistência a esses antimicrobianos, existe uma proteína adicional PBP2a (*penicilin-binding protein 2a*), que não possui afinidade por β -lactâmicos, e isso as tornam resistentes a oxacilina que é similar a meticilina, e que está diretamente relacionado ao gene *mecA* (GELATTI, *et al.*, 2009).

A *S. aureus* MRSA já foi considerada maior causa de infecção na Europa, estas cepas MRSA causaram em torno de 171 mil infecções durante ao ano (KÖCK, *et al.*, 2014). Nos EUA, a MRSA foi a causa de ao menos 80 mil infecções, resultando em 11 mil mortes ao ano (FRIEDEN, 2013). Na América Latina, um estudo realizado em 11 países entre 2004 e 2007 observou que a prevalência de MRSA foi de 48% (MEIJA, *et al.*, 2010)

A vancomicina é a droga de escolha em infecções graves de *S. aureus* MRSA, toda via, existem amostras com sensibilidade diminuída a este medicamento, neste caso são denominadas VISA (*vancomycin-intermediate S. aureus*) (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008). Em 1996, no Japão, foi reportado o primeiro caso de resistência plena à vancomicina (VRSA) (HIRAMATSU, 2001) e posteriormente a ele, surgiram outros relatos pelo mundo, em 2000 no Brasil e 2002 nos EUA, demonstrando que este se tornou um problema global (SANTOS, *et al.*, 2007).

2.1.2 *Escherichia coli*

A bactéria *E. coli* faz parte da família das *Enterobacteriaceae*, que são bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos, e está presente na microbiota humana intestinal. Estes patógenos estão entre os principais agentes de infecções hospitalares em seres humanos (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

As doenças causadas pela *E. coli* incluem as infecções intestinais, porém ela também pode causar diversas infecções extra intestinais. É considerada a principal causa de infecção no trato urinário. No ambiente hospitalar tem sido considerado agente de meningite, pneumonias, septicemia, dentre outras (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008). Segundo Forde, *et al.* (2018) a *E. coli* ST95, cepa que causa infecções extra intestinais está frequentemente associada a infecções sanguíneas e meningite neonatal.

A colistina é antimicrobiano de largo espectro, que pertence à família das polimixinas, e tem sido utilizada no combate de bactérias Gram-negativas, tanto para humanos quanto para animais. Por exemplo, a colistina vem sendo utilizada há anos extensivamente na alimentação de animais, como medida protetiva contra infecções (KEMPF, *et al.*, 2016). A resistência a este medicamento é o resultado de mutações cromossômicas transmitidas de maneira vertical (para os descendentes) que resultam em modificações no Lipopolissacarídeo (LPS), um dos principais componentes da membrana externa (FORDE, *et al.*, 2018).

O primeiro relatado de *E. coli* resistente a colistina mediada por plasmídeos ocorreu na China, em estudo realizado em suínos, alimentos e humanos, esta resistência é caracterizada como uma alteração genética associado ao gene *mcr-1*. A disseminação de genes de resistência como *mcr-1* por meio dos plasmídeos (moléculas de DNA extra-cromossomal) é uma preocupação global, pois, esta resistência colistina pode ser transferida à *E. coli* patogênica humana, e a outras bactérias de gêneros e espécies distintas (LIU, *et al.*, 2016).

Um estudo multicêntrico realizado no Brasil demonstrou o aparecimento do gene *mcr-1*-positivas na América Latina desde o ano de 2012, em cepas isoladas a partir de alimentos, animais e dos seres humanos (FERNANDES, *et al.*, 2016).

O surgimento de cepas *mcr-1* e *mcr-2* representa uma mudança de paradigma nos mecanismos de resistência a colistina, que antes se restringiam a transmissão vertical e agora se sabe, que estas resistências podem ocorrer entre as bactérias (transmissão horizontal) através dos plasmídeos (XAVIER, 2016). O aparecimento desta resistência torna a vida útil das polimixinas mais curta (PATERSON; HARRIS, 2016).

Apesar do surgimento de novos antibióticos para bactérias Gram-negativas como associação de ceftazidima e avibactam, estes não têm cobertura total sobre as bactérias. Neste sentido, ainda se faz necessário o uso das polimixinas que devido a sua nefro e neurotoxicidade somente é utilizado como último recurso para o tratamento de infecções por bactérias multirresistentes (PATERSON; HARRIS, 2016; ZURFLUH, *et al.*, 2017).

2.1.3 Mecanismo de ação dos antibióticos

Os antibióticos são fármacos utilizados para o tratamento de infecções bacterianas e podem atuar de duas maneiras, causando a morte bacteriana, e neste caso são denominados de bactericidas, ou promovendo a inibição do seu crescimento, e denomina-se bacteriostático. Essas substâncias podem ser de origem natural, derivados semissintéticos ou sintética (TORTORA *et al.*, 2012).

Os antibióticos de origem natural e semissintéticos compõem a maioria dos antibióticos em uso clínico. As classes mais utilizadas incluem os β -lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos, estreptograminas, entre outros. São exemplos de classes de antibióticos de origem sintética as sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (GUIMARÃES, 2010). A Tabela 1 apresenta as classes, alvos e principais mecanismos de ação destes agentes terapêuticos.

Tabela 1- Principais classes, alvos e mecanismos de ação de classes dos antibióticos.

Antibióticos	Alvo	Mecanismo de Ação
β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, monobactamas)	Enzima transpeptidase	Inibição da ligação cruzada entre cadeias de peptidoglicano, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana.
β -lactâmicos (oxapeninas, sulfoxapeninas)	Enzima β -lactamase	Inibição da enzima de resistência bacteriana, que degrada antibióticos β -lactâmicos.
Macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas	Subunidade 50S ribossômica	Inibição da síntese proteica bacteriana

(dalfopristina e quinupristina), cloranfenicol, oxazolidinonas (linezolid)		
Aminoglicosídeos, tetraciclina	Subunidade 30S ribossômica	Inibição da síntese proteica bacteriana.
Glicopeptídeos (vancomicina, teicoplanina)	Dipeptídeo terminal D-Ala-D-Ala do peptídeoglicano	Complexação com as cadeias peptídicas não ligadas e bloqueio de transpeptidação, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana.
Peptídeos não ribossomais (bacitracina, gramicidina C, polimixina B)	Membrana plasmática	Afetam permeabilidade da membrana bacteriana por facilitarem o movimento descontrolado de íons através da membrana.
Lipopeptídeos (daptomicina)	Membrana plasmática	Afeta permeabilidade da membrana bacteriana e bloqueia síntese de ácido pipoteicoico, componente da membrana externa de bactérias Gram positivas.
Rifampicina	RNA polimerase dependente de DNA	Inibição da síntese de RNA
Fluoroquinolonas	Enzima DNA girasse	Bloqueio da replicação e reparo do DNA.
Sulfonamidas	Enzima di-hidropteroato sintetase	Bloqueio da formação de cofatores do ácido fólico, importantes para síntese de ácidos nucleicos.

Fonte: GUIMARÃES, 2010.

Alguns antibióticos podem atuar na inibição da síntese de parede celular. Os principais compostos com essas características são as penicilinas, cefalosporinas, bacitracina e vancomicina, que previnem a síntese de peptídeoglicano, encontrado apenas na parede celular da bactéria (TORTORA *et al.*, 2012). Outros antibióticos atuam na síntese proteica sobre os ribossomos 70S constituídos pelas unidades 50S e 30S, como por exemplo o cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina e estreptomicina (TORTORA *et al.*, 2012). O grande problema neste caso é que os ribossomos mitocondriais das células eucariontes, que são semelhantes aos bacterianos, e, portanto, esse mecanismo de ação pode causar dano também a célula do hospedeiro. Os antibióticos rifampina e quinolona inibem a replicação de ácidos nucleicos que interferem no processo de replicação de DNA e transcrição em microrganismos. Todavia, os mesmos também podem interferir no DNA e RNA de mamíferos (TORTORA *et al.*, 2012). As polimixinas são antibióticos polipeptídicos catiônicos que interagem com os lipopolissacarídeos e fosfolipídios da membrana externa de bactérias Gram-negativas (BARON, 2016).

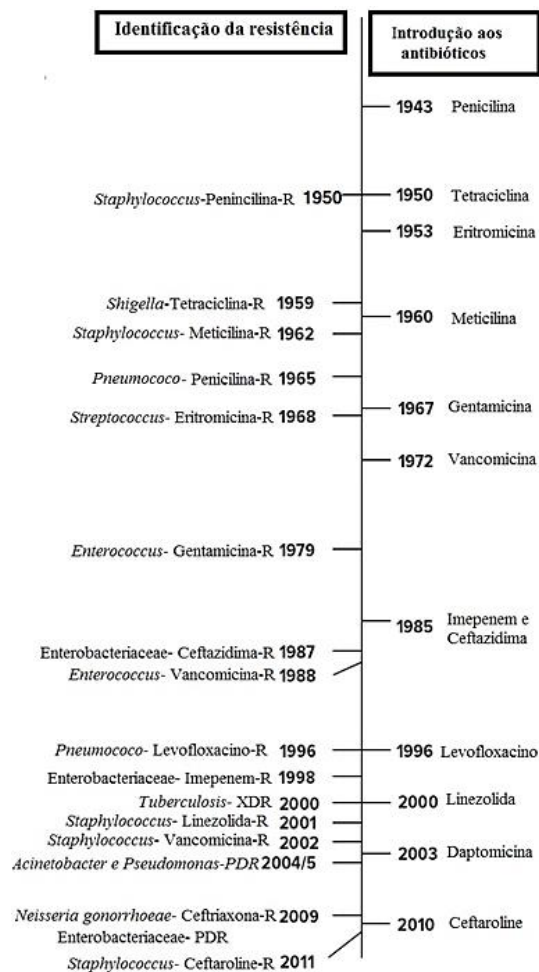
2.1.4 Mecanismos de resistência bacteriana

Os antimicrobianos ajudaram a salvar muitas vidas, além de proporcionarem o avanço da medicina, porém, tem surgido bactérias resistentes a antibióticos em decorrência de sua

utilização indiscriminada e falta de investimento em desenvolvimento de novos fármacos, comprometendo o seu uso (VENTOLA, 2015).

A era moderna dos antibióticos começou com a descoberta da penicilina por Sir Alexander Fleming, e sendo muito utilizada na década de 1940 em infecções sérias em soldados na II Guerra Mundial (ALANIS, 2005; VENTOLA, 2015). Entretanto, o uso de antibióticos passou a ser utilizado para tratar infecções triviais e até mesmo de origem não bacteriana, e assim se observou a resistência a penicilina em já 1950. Em resposta a esta resistência foi desenvolvido os betalactâmicos, porém na mesma década registrou a resistência a metilina em *S. aureus* como mostra a Figura 2 (VENTOLA, 2015).

Figura 2 – Linha do tempo demonstrando a inserção dos antibióticos e o aparecimento de resistência.



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

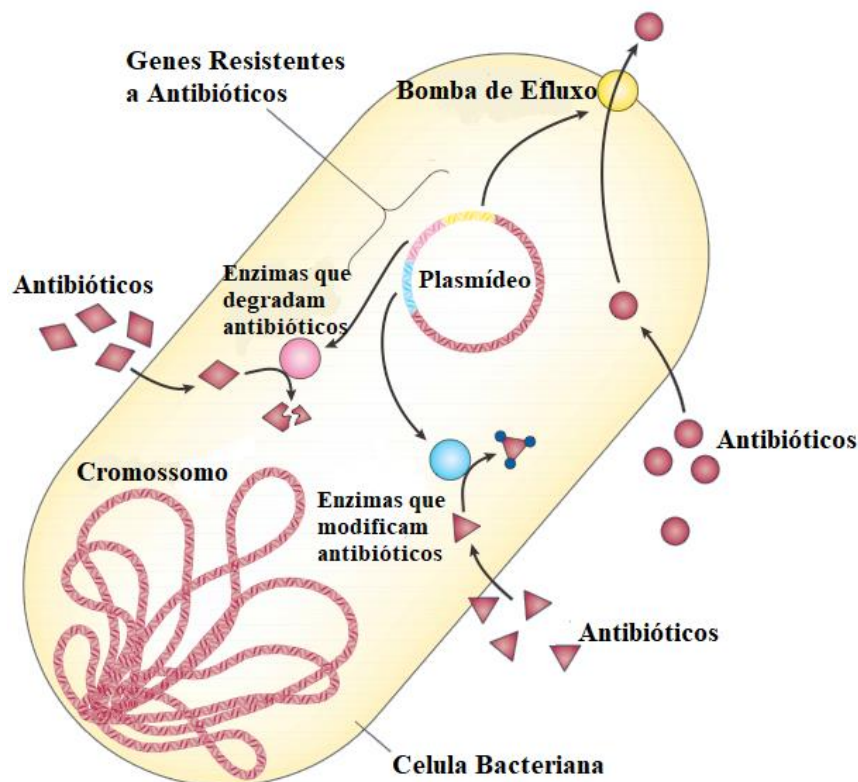
Fonte: Adaptado de Frieden, (2013).

Os antibióticos são uma fonte de recurso limitado contra as infecções bacterianas, e quanto mais forem utilizados hoje, menos efetivos serão no futuro. Nota-se que em 50% das vezes que os antibióticos são prescritos, eles não seriam realmente necessários (FRIEDEN, 2013).

Estima-se que em 2050, caso nenhuma medida seja tomada, serão mais de 10 milhões de mortes por ano em decorrência de microrganismos resistentes a antibióticos. Esta projeção é um indicativo de que microrganismos resistentes a antibióticos poderão matar mais do que o câncer e outras doenças, a um custo cumulativo para a produção econômica 100 trilhões de dólares (O'NEILL, 2016).

Destacam-se quatro mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos que podem ser visualizados na Figura 3: 1) a modificação ou destruição enzimática do antibiótico; 2) a prevenção da acumulação intracelular do antibiótico através da redução da permeabilidade celular ao antibiótico como as bombas de efluxo dos antibióticos das células bacterianas; 3) as alterações nas moléculas alvo dos antibióticos (não demonstrado); e 4) a produção de moléculas alvo alternativas que não são inibidas pelo antibiótico (LOUREIRO, 2016).

Figura 3 - Principais mecanismos de resistência bacteriana.



2.3 Princípios da terapia fotodinâmica

A ação antimicrobiana pela terapia fotodinâmica (TFD) foi descrita pela primeira vez em 1900 quando Oscar Raab utilizou os corantes acridina alaranjada e eosina sobre o *Paramecium caudatum* (RAAB, 1900; WAINWRIGHT, *et al.*, 2016). Após esta descoberta seus alunos em 1903, H. Von Tappeiner e A. Jesionek, iniciaram um estudo tratando tumores de pele, com eosina aplicada topicamente e luz branca. Eles descreveram o fenômeno observado nos estudos como ação fotodinâmica em 1907, hoje a conhecida TFD (DOLMANS, 2003).

A TFD é caracterizada por um conjunto de processos físicos, químicos e biológicos, que ocorrem em virtude da administração de FSs, seguidos de irradiação luminosa (FERREIRA; MENEZES, 2008). A TFD tem o objetivo de causar destruição seletiva de um tecido. A sua aplicação consiste na utilização de um FS, tópico ou sistêmico, seguido de irradiação luminosa. Nesse processo, os FSs são ativados pela luz e transferem energia ao oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) que induzem a morte celular (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

As vantagens TFD são a seletividade, pois o FS pode ser direcionado apenas para as células ou tecido doente e a luz também pode ser focalizada no local exato da lesão. O procedimento pode ser repetido várias vezes pelo fato de não apresentar efeito tóxico cumulativo (PERUSSI, 2007). No caso do uso de FSs sistêmicos, a droga é injetada na corrente sanguínea, percorre todo o corpo e é absorvido por todas as células. Entretanto, as células saudáveis têm a capacidade de eliminar o FS mais rapidamente, em torno de 24 a 36h, enquanto que as células neoplásicas retêm a droga por até 72h (FERREIRA; MENEZES, 2008). Neste sentido, a exposição à luz deve ser evitada, dependendo do composto até por algumas semanas, pois poderá apresentar um efeito colateral que é a sensibilização a luz (PERUSSI, 2007).

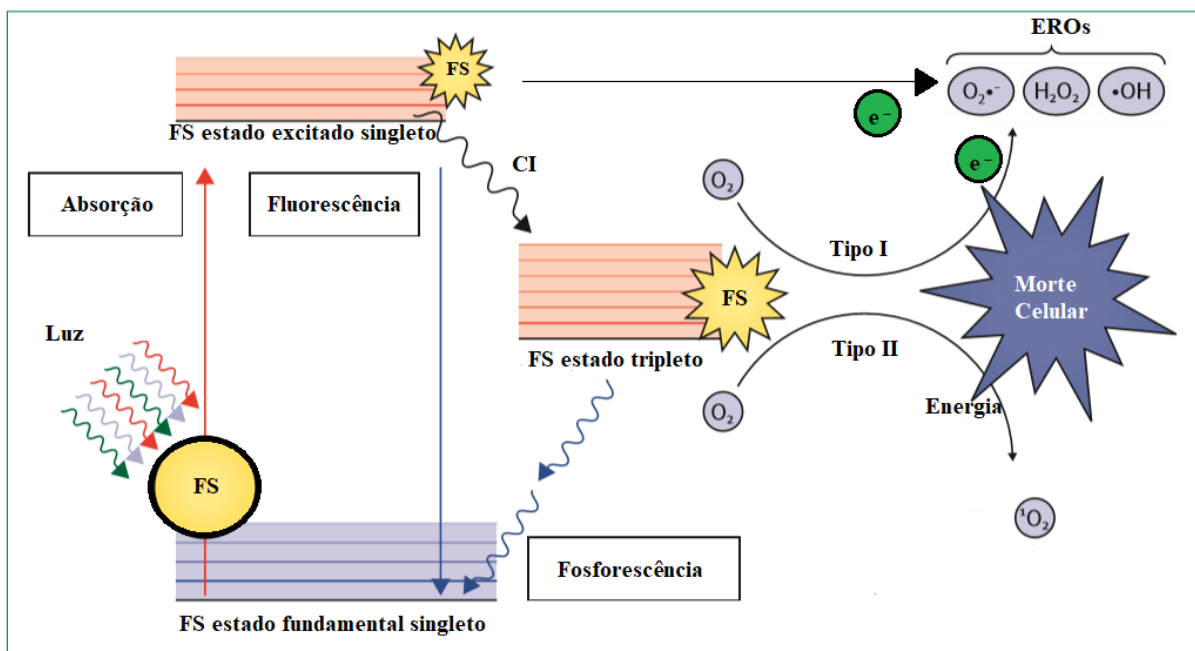
E embora ao longo dos anos a TFD tenha se desenvolvido visando à terapia de câncer, alguns trabalhos vêm demonstrando o seu grande potencial para outras moléstias, como a eliminação de bactérias resistentes a tratamentos tradicionais a base de antibióticos. Nessa modalidade de tratamento, a terminologia mais utilizada é Inativação Fotodinâmica (IFD) (DEMINOVA; HAMBLIN, 2005; MACHADO, 2000).

Tanto para a TFD quanto para IFD há uma combinação sinérgica do FS, oxigênio molecular (O₂) e irradiação luminosa. O FS funciona como um intermediário absorvendo a

luz e transferindo a energia para o oxigênio. Nesse processo, o oxigênio molecular presente na célula no estado tripleto ($^3\text{O}_2$), estado fundamental, pode passar para o estado singleto ($^1\text{O}_2$). Ao contrário do estado tripleto, o estado singleto é extremamente reativo e induz a morte da célula hospedeira a partir da oxidação de seus constituintes (RIBEIRO, *et al.*, 2005).

O processo fotodinâmico pode ser classificado em dois mecanismos de geração de EROs, denominada tipo I e II. O mecanismo tipo I (transferência de carga) gera espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila) através da transferência de elétrons do FS, excitado pela luz, para o oxigênio no estado fundamental. O mecanismo tipo II (transferência de energia) ocorre quando há transferência de energia do FS para o oxigênio molecular, que passa para o estado excitado singleto, que é altamente reativo (HAMBLIN, 2016; RIBEIRO, 2008). Os mecanismos tipo I e II estão representados na Figura 4, que apresenta o diagrama de Jablonski.

Figura 4 - Diagrama de Jablonski simplificado.



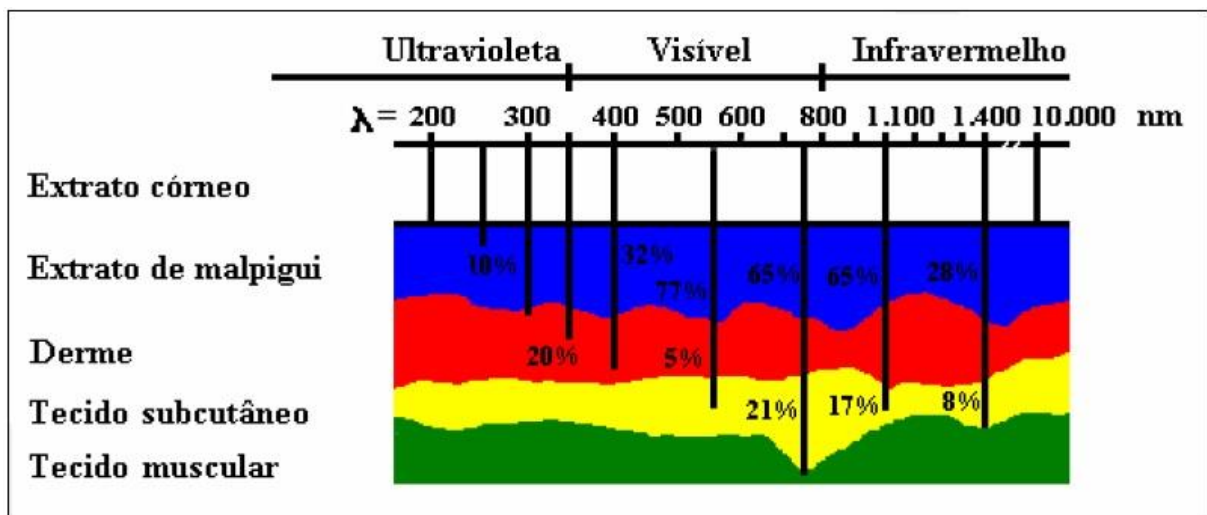
Onde: FS= Fotossensibilizador, cruzamento de intersistema (CI), O_2 = oxigênio molecular, EROs= espécies reativas de oxigênio, e^- = elétron.

Fonte: Adaptado de WAINWRIGHT, *et al.*, 2016.

Quando o FS é irradiado com luz, no comprimento de onda adequado, o elétron é excitado do estado fundamental, passando para o estado singleto, este elétron pode retornar ao estado fundamental emitindo energia (fluorescência), ou passar para o estado tripleto através de uma

inversão de spin por meio do processo conhecido como cruzamento de intersistema (CI). (FERREIRA; MENEZES, 2008). A interação da luz com os tecidos depende de relações entre o espalhamento e absorção, e que por sua vez, são influenciadas pelo comprimento de onda da luz e dos tecidos envolvidos. Os tecidos possuem proteínas e DNA que absorvem na região do ultra-violeta, enquanto a hemoglobina absorve na região do verde-amarelo do espectro visível. Dessa forma, a faixa espectral entre 600-800 nm é a região ideal para que não haja competição entre os cromóforos endógenos, onde a penetração da luz no tecido é de 1 a 5 cm, como pode ser observado na figura 5 (FERREIRA, MENEZES, 2008).

Figura 5 - Espectro da radiação eletromagnética e sua penetração nos tecidos



Fonte: Menezes, 2007.

Existem compostos que possuem a absorção máxima em 405 nm, sendo as porfirinas uma delas, porém neste comprimento de onda a luz é capaz de atravessar a pele de 1 a 2 mm. Estas moléculas também possuem outros picos de absorção, com comprimentos de onda que variam de 510 a 630 nm, que possibilita uma maior penetração da luz (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010). Neste contexto diversas fontes de luz podem ser utilizadas, estas podem ser ou não colimadas e coerentes, como lasers, LEDs, lâmpadas halogênicas e a própria luz solar em alguns casos.

2.3.1 Resistência a IFD

A resistência a IFD é um assunto controverso, pois apesar da maioria dos trabalhos afirmarem que a resistência a IFD seja improvável, tese defendida por vários autores

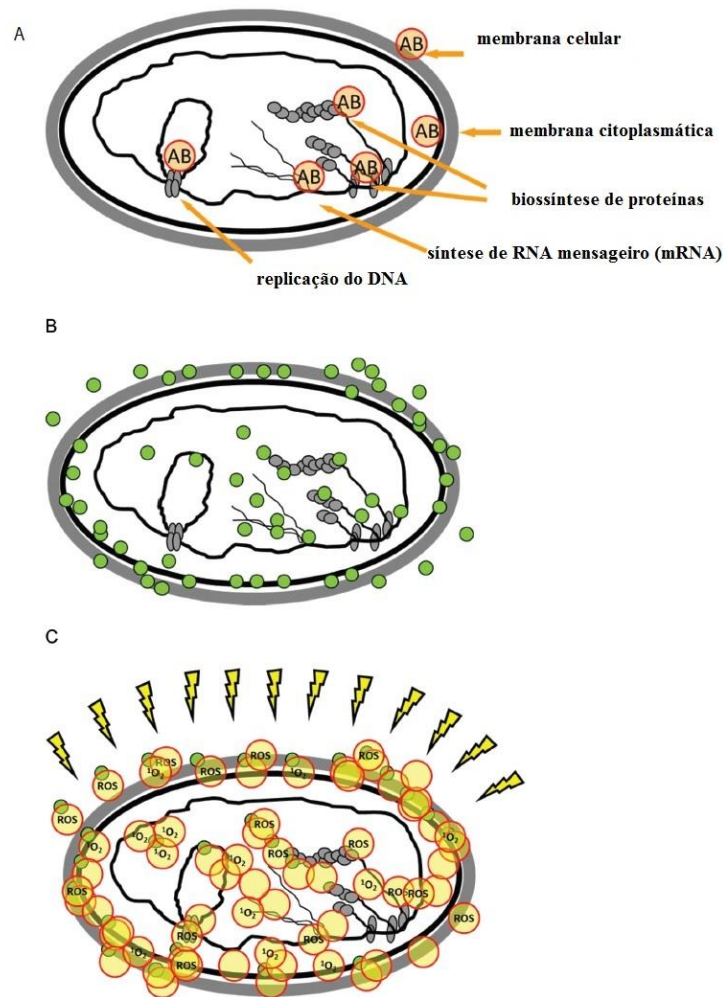
renomados em virtude do seu mecanismo ação que induz a morte celular por meio de uma ação em multi-sítios (EROs causam danos em diversas estruturas bacterianas simultaneamente), ainda existem dúvidas com relação à capacidade destes microrganismos se adaptarem a IFD (TAVARES, *et al.* 2010).

Na tentativa de induzir a resistência à IFD, eliminando repetidamente e renovando amostras bacterianas, Bartolomeu, *et al.*, (2016) demonstraram em seu estudo que após submeter *S. aureus* ATCC e MRSA a IFD, as cepas sobreviventes do 1 ciclo eram submetidas ao IFD por mais 9 ciclos, promovendo a inativação de ambas as cepas mesmo após 10 ciclos de IFD, sem que houvesse fotoresistência. A ausência de mecanismos de resistência, tem sido demonstrada em alguns trabalhos, como Tavares e colaboradores (2010) após 10 ciclos e Giuliani, *et al.* (2010) após 20 ciclos.

Em trabalho realizado por Pedgo et al., (2009) utilizando como FS o Azul de Metileno (AM) e a luz vermelha (670 nm), repetições da IFD foram realizadas em cepas sobreviventes submetidas a doses subletais, observou-se que em *S. aureus* MSSA e MRSA não houve diferença na susceptibilidade a IFD entre as cepas em até 25 repetições e *E. coli* após 11 repetições.

Uma das grandes vantagens do IFD é sua ação em vários sítios, não havendo uma especificidade, diferentemente dos antibióticos que tem um único sítio de ação na célula bacteriana, e, portanto, após sua exposição o microorganismo pode desenvolver mecanismos de resistência. Apesar do FS ter especificidade com relação ao alvo, o microorganismo, as estruturas que podem ser afetadas são variadas, como ribossomos, cromossomos, e enzimas, como mostra Figura 6 (MAISCH, T., 2015).

Figura 6 – Diferença entre a atuação dos antibióticos e dos fotossensibilizadores nas bactérias.



Nota: (A) demonstra a ação localizada de diferentes antibióticos (AB) em diferentes sítios de ação; (B) Localização não específica (multi-sítios) do fotossensibilizador antes da irradiação; (C) Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) após iluminação.

Fonte: Adaptado de MAISCH, T., (2015).

Segundo Maisch, (2015), alguns microrganismos podem possuir maior tolerância a IFD, mas não por serem selecionadas no processo fotodinâmico, e sim, devido as cepas serem mais fortes, e terem adquirido um conhecimento genético, gerando uma resistência/suscetibilidade intrínseca para sobreviver ao estresse oxidativo proporcionado no meio ambiente.

Apesar de vários trabalhos afirmarem que devido a ação multisítio, a IFD não gera resistência, um estudo realizado por Snell *et al.* (2021) demonstrou o desenvolvimento de tolerância a IFD frente a duas cepas de *S. aureus* HG003 e *S. aureus* ATCC 25923 após 7

ciclos utilizando AM. Também foi observado a tolerância de estruturas similares como a fenotiazina a Azul de Toluidina (ATO). Além disso, foram realizadas análises transcricional e genômica onde verificou-se múltiplas vias metabólicas, biogênese da parede celular, recombinação e reparo de DNA, que foram associadas à tolerância a IFD.

2.3.2 Fotossensibilizadores

O descobrimento acidental de que o uso de que certos corantes incubados em microrganismos podem eliminá-los, quando expostos a luz na presença do oxigênio molecular, foi nomeada de ação fotodinâmica. Na época o trabalho não alcançou a repercussão merecida. A aplicação desta técnica foi deixada de lado em virtude da descoberta dos antibióticos e pela grande expansão da indústria farmacêutica (ABRAHAMSE e HAMBLIN, 2016).

A era moderna da TFD iniciou-se somente na década de 60, quando iniciaram os estudos com as hematoporfirinas (DOLMANS, 2003). Mas foi somente na década de 70 que as pesquisas foram impulsionadas pelo grupo liderado por Dr Thomas Dougherty, utilizando uma porfirina solúvel em água com o nome de hematoporfirina derivativa (HpD) (ABRAHAMSE and HAMBLIN, 2016).

Os FSs utilizados na TFD podem ser classificados de acordo com o seu surgimento. Neste sentido são considerados FSs de primeira geração as porfirinas, hematoporfirinas e suas derivações como a HpD (ALLISON e SIBATA, 2010). A HpD foi a primeira substância solúvel em água, e após seu aperfeiçoamento, foi denominado um nome comercial Photofrin[®]. Contudo, apesar deste ainda ser o FS mais utilizado no mundo, o mesmo possui uma serie de desvantagens como a fotossensibilidade que pode permanecer durante semanas (ABRAHAMSE e HAMBLIN, 2016).

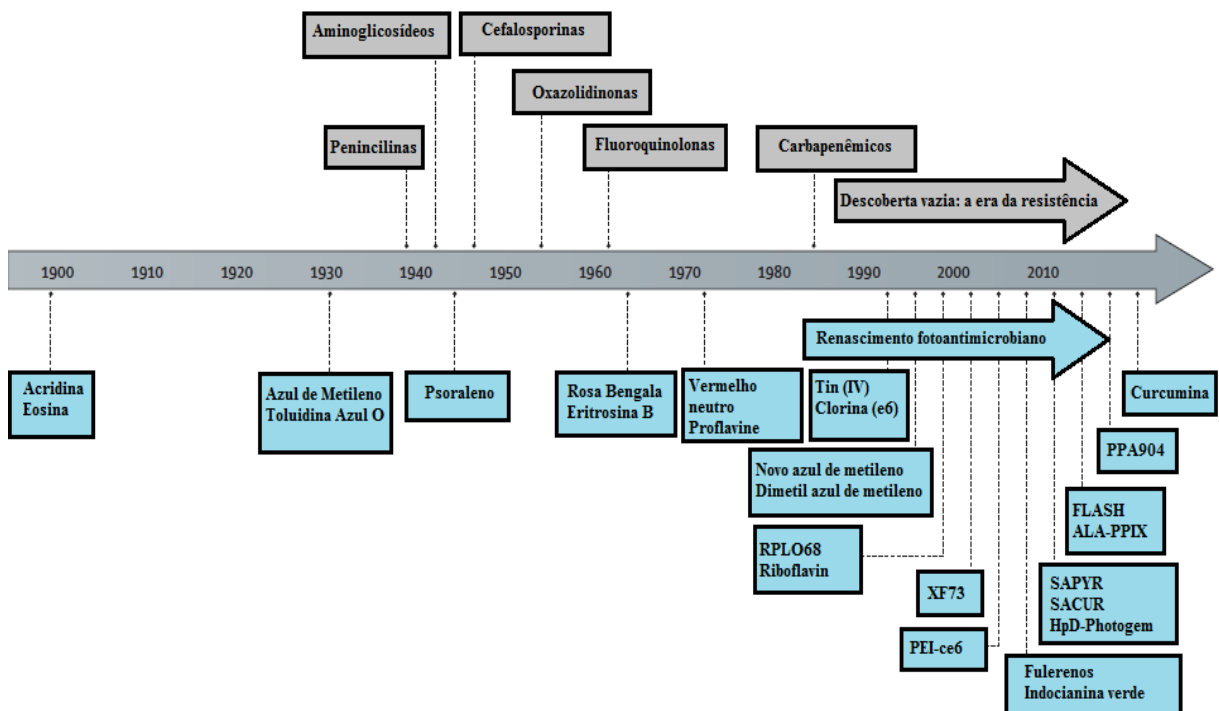
A segunda geração de FSs foi criada com o objetivo de sanar as desvantagens da primeira geração, diminuindo o período de fotossensibilidade (ALLISON and SIBATA, 2010). Como exemplos de FSs de segunda geração temos as metaloporfirinas (Lutrin[®] e Lutex[®]), porfícenos, feoforbideo (Tookad[®]), purpurina (Purlytin[®]), ftalocianinas e clorinas (Foscan[®]), fenotiazinas (azul de metileno, azul de toluidina), cianinas, xantenos (rosa bengala) dentre outros (ZHANG *et al.*, 2018). Nesta classificação também está incluído o ácido 5-aminolevulínico (ALA) que ao acumular no tecido produz excesso de protoporfirina IX que atua como um FS endógeno (ULIANA *et al.*, 2017).

A terceira geração de FSs compreendem a primeira e segunda geração com modificações conjugando polímeros, anticorpos e nanomateriais que conseguem direcionar melhor o FS ao tecido alvo (ALLISON e SIBATA, 2010, ULIANA *et al.*, 2017).

Os FSs mais estudados para o câncer têm núcleo tetrapirrólico, como as porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e ftalocianinas. Diferentemente, para o propósito antimicrobiano são mais utilizados os xantenos, naphthodianthrone (hipiricina), sais fenotiazínicos e corantes azures. Para a IFD é importante que a molécula possua preferencialmente carga catiônica (TEGOS; HAMBLIN, 2006).

É importante destacar que a evolução do TFD teve uma grande lacuna, até a aprovação do ALA (*Food and Drug Administration*) para tratamento de Queratose actínica (QA) que é uma lesão pré-cancerígena (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010), como demonstra a Figura 7. Mas apesar da TFD ter se tornado uma realidade, a PDI ainda é pouco utilizada (WAINWRIGHT, *et al.*, 2016).

Figura 7 - Evolução dos antibióticos e fotossensibilizadores.



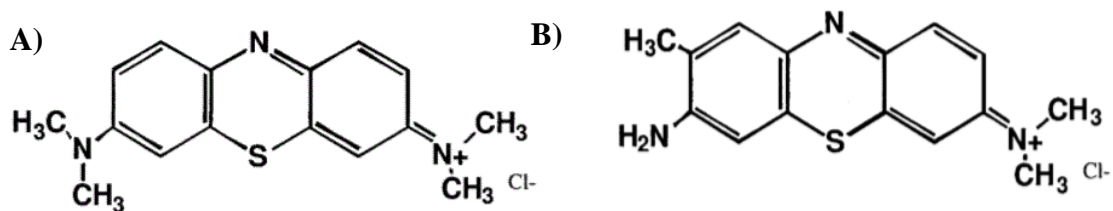
Onde : RLP068 = Tetracatiônico Zn (II) cloreto de ftalocianina. XF73 = porfirina carregada positivamente. PEI-ce6 = polietilenoimina clorina (e6) conjugado. SAPYR = derivado de perinaptentona. SACUR = derivado de curcumina. HpD-Photogem = derivado de haematoporfirina. FLASH = derivado de riboflavina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

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

2.3.3 Fenotiazinas

Os sais fenotiazínicos mostraram sua capacidade para tratar tumores em estudos tanto *in vitro* como *in vivo*, e tem mostrado sua eficiência no combate a diversos microrganismos. Os compostos AM e ATO, estrutura química figura 8, são utilizados juntamente com a luz vermelha, para desinfecção de cavidade dentaria e está sendo proposta para o tratamento de periodontite (TEGOS; HAMBLIN, 2006). Atualmente diversos estudos com fenotiazínicos estão em fase de testes clínicos como infecções localizadas por MRSA, sinusites, halitose, periodontite, candidíase oral, onicomicose dentre outros (WAINWRIGHT, *et al.*, 2016). Os fenotiazínicos apresentam uma grande absorção entre 600-660 nm. O AM, ATO e Azure B se ligam ao DNA de espécies mais simples como bacteriófagos. Em bactérias, o sítio de ação do azul de metileno é o DNA e do azul de toluidina é a membrana (PERUSSI, J. R., IMASATO, H., 2008).

Figura 8 - Estrutura químicas dos fenotiazínicos mais utilizados em PDI.



Nota: Onde A) indica a fórmula da substância Azul de Metileno e B) da Azul de Toluidina.
Fonte: Tegos; Hamblin, 2006.

2.3.3.1 Eosina azul de metileno segundo Giemsa

O surgimento do corante Wright-Giemsa está intimamente ligado ao descobrimento do agente etiológico da malária e, faz parte da sua história, um passado de receitas clandestinas e de mistério que o rodeia ainda hoje, assume a vez que pequenas variações na composição do corante, ou da técnica de coloração, produzem mudanças importantes para visualização das estruturas (WORONZOFF-DASHKOFF, 2002).

O *Plasmodium* foi descoberto pelo francês Alphonse Laveran em 1880, utilizando azul de metileno, mas um diagnóstico adequado para malária ainda era complicado no início do

século XX, pois as propostas existentes de coloração eram de difícil manuseio e reprodução (FLEISCHER, 2004).

A visualização do núcleo do *Plasmodium* só foi possível pela descoberta de um novo corante, compostos pelos AM e eosina. Malachowski produziu uma versão a partir da coloração de Chenzinsky, mas quando publicou seu achado em 1891 não deu detalhes de como reproduzi-lo. Apenas 3 semanas depois em São Petersburgo, o russo Romanowsky, publicou suas descobertas semelhantes em um artigo que ficou marcado. Após este trabalho todas as substâncias de composição análoga foram chamadas de corantes do tipo Romanowsky (WORONZOFF-DASHKOFF, 2002).

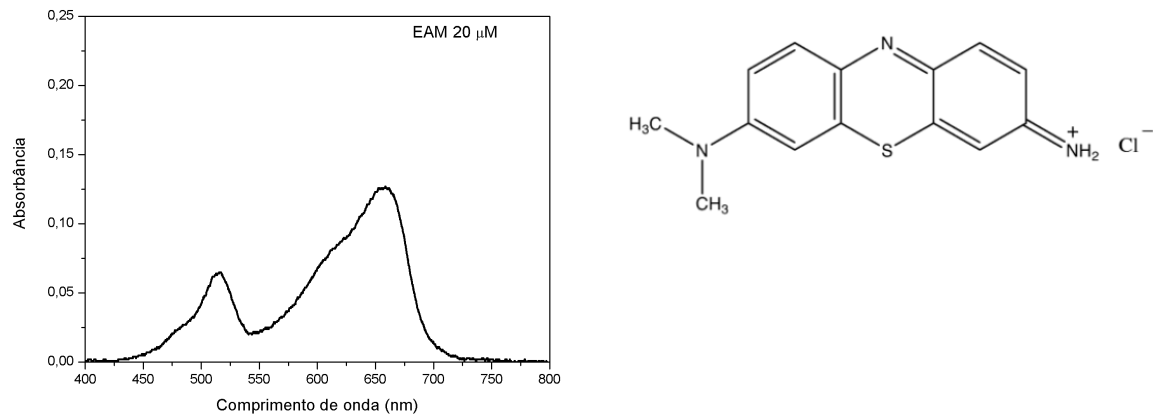
São considerados corantes do tipo Romanowsky, os corantes Giemsa, Leishman e Wright, pois apresentam em sua composição Azur B/azul de metileno-eosina (HOROBIN, 2011). Os corantes tipo Romanowsky tinham em comum na sua composição azul de metileno e eosina, após alguns anos desta descoberta, em 1904, Giemsa publicou em seu trabalho um produto da oxidação do azul de metileno chamado azur I, sendo misturas híbridas de azur A e azur B, com traços de azur C e violeta de metila (GURR, 1964).

Segundo Barcia (2007), Giemsa também trabalhou em um composto denominado Azur II que é a mistura equimolar de Azur I e Azul de metileno e este composto começou a ser comercializado pela empresa Gruber Co., empresa que posteriormente desenvolveu o eosinato de Azur II.

O composto AM em sua forma pura tem pequeno papel na coloração de nucléolos, grânulos de neutrófilos e citoplasma de monócitos, porém sua forma oxidada é responsável pelo núcleo roxo avermelhado e corpos vermelhos de cromatina, e quanto mais oxidado maior é sua capacidade de corar (WORONZOFF-DASHKOFF, 2002).

Os corantes tiazínicos azur A, azur B, azur C, violeta de metila e a tionina são denominados corantes básicos porque se ligam a componentes celulares ácidos, como DNA, RNA e matrizes granulares específicas de neutrófilos (WORONZOFF-DASHKOFF, 2002). O corante Giemsa, sua estrutura química pode ser observada na figura 9 logo abaixo, é um fenotiazínico segundo Sabins (2010) e considerado como múltiplo, pois em uma única coloração é possível se obter cores diferentes para componentes dos tecidos (BARCIA, 2007). Trabalhos recentes vêm demonstrando também seu potencial como FS para eliminação de bactérias e o controle de larvas de *Aedes aegypti* (CAIRES, *et al.*, 2017, CAIRES, *et al.*, 2018, LIMA, *et al.*, 2018).

Figura 9 - Absorbância e fórmula química do Giemsa.

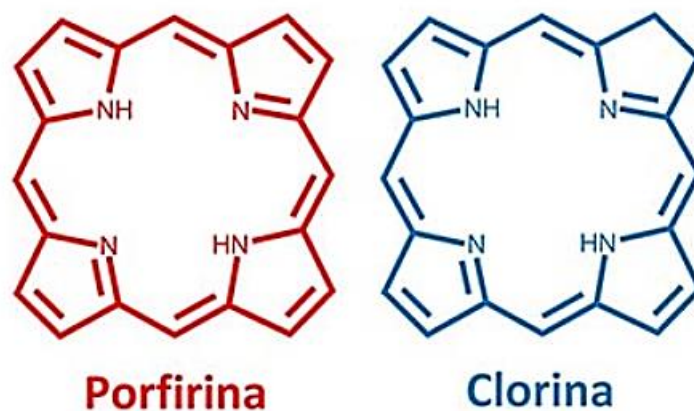


Fonte: Absorbância o autor e Fórmula química SABNIS, 2010.

2.3.4 Clorinas

As clorinas são derivados tetrapirrólicos, que podem ser sintéticos ou naturais. A clorofila, uma das clorinas naturais maior importância, serve de ponto de partida para o desenvolvimento de novos FSs, como o Photodithazine[®], clorina e6 dentre outros (ULIANA *et al*, 2017). Em termos de estrutura química, as clorinas se diferenciam das porfirinas pela redução de um anel pirrol que provoca uma alteração na simetria da molécula assim como na sua conjugação, assim como pode ser observado na figura 10. Como característica espectroscópica, as clorinas absorvem na região do azul e do vermelho, e as porfirinas absorvem fortemente no azul (CALVETE, *et al*, 2009).

Figura 10 - Estrutura química das porfirinas e clorinas.



Fonte: CALVETE, *et al*. (2009).

2.3.4.1 Clorofilina cúprica de sódio

A clorofila possui baixa estabilidade, que pode ser superada ao modificar quimicamente a molécula, substituindo o Mg^{2+} por outros íons metálicos (por exemplo: Zn^{2+} , Fe^{2+} e Cu^{2+}), pois sabe-se que as metalo-clorofilas são mais estáveis e podem ser utilizadas em formulações hidro e lipossolúveis (STREIT *et al.*, 2005).

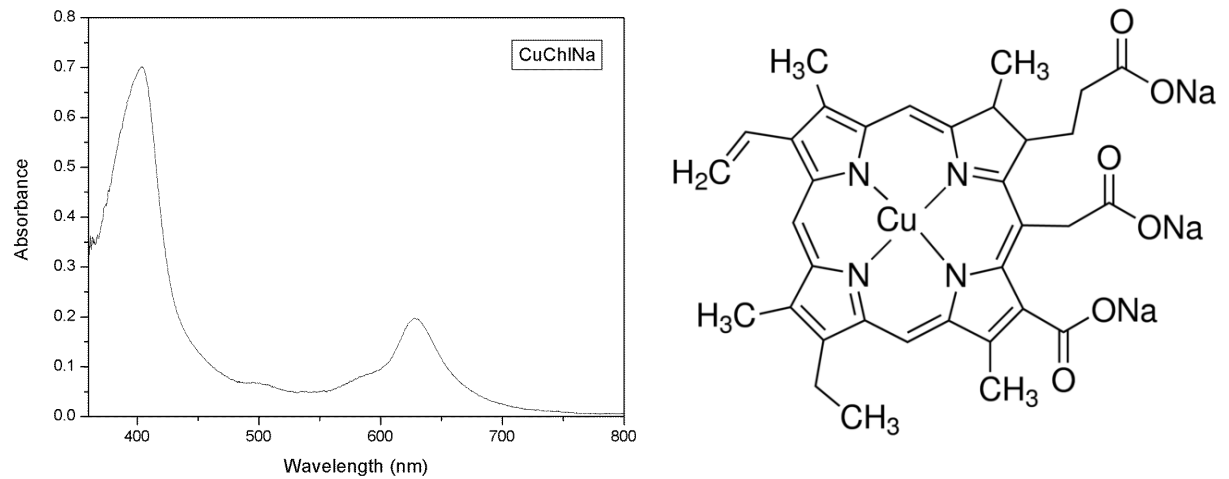
A clorofilina cúprica de sódio (E-141ii) é um pigmento obtido a partir da clorofila através da hidrólise do seu fitil e metil esters, clivagem do anel ciclopentanona e substituição do Mg^{2+} por Cu^{2+} , tendo a estrutura química como representada na figura 10. As metaloclorofilinas diferentemente da clorofila, são hidrossolúveis e apresentam maior estabilidade frente a ácidos e agentes oxidantes (GEROLA *et al.*, 2011; TUMOLO; LANFER-MARQUEZ, 2012; VOLP, 2009). A E-141ii é comercialmente disponível e é utilizada como corante de alimentos em diversos países. Na Europa sua aprovação vem desde 1995, nos EUA a partir 2002, e no Brasil desde 2008 (TUMOLO; LANFER-MARQUEZ, 2012; YOSHIME, 2011).

Existem dois corantes naturais verdes liberados para o uso na Europa o E-140 e E-141, estes ainda podem ser subdivididos de acordo com a sua solubilidade, onde o E-140i é um derivado da clorofila lipossolúvel, a alternativa para alimentos solúveis em água é a E-140ii. O E140ii é uma clorofilina obtida a partir da saponificação do extrato de plantas comestíveis, entretanto esse corante não é estável podendo passar rapidamente do verde para o marrom, a solução para esta instabilidade é a substituição do magnésio no centro da molécula pelo cobre, fazendo com que a cor verde não se altere em diversas condições de armazenamento. As E-141i são clorofilas cúpricas lipossolúveis e a opção hidrossolúvel utilizada é clorofilina cuprica a E-141ii (VIERA, *et al.*, 2019).

A clorofila é fonte de matéria prima para diversos FSs, e do ponto de vista da espectroscopia, é parecida com a E-141ii. Isto significa uma intensa banda de absorção no comprimento de onda 630 nm, o que é ideal para TFD (UCHOA, *et al.*, 2015). Em estudo recente, observou-se que a E-141ii não apresenta fluorescência e que o mecanismo de relaxamento do primeiro estado excitado é por conversão interna. Esse estudo também sugere que a substância não apresenta estados tripletos (SCIUTIA, 2018). Todavia, trabalhos vêm demonstrando essa substância como um bom FS para bactérias Gram-positivas (CAIRES, *et al.*, 2017; LÓPEZ-CARBALLO, *et al.*, 2008; LÓPEZ-CARBALLO, *et al.*, 2018). Caires *et al.* (2017) demonstrou que o espectro de absorbância do composto E-141ii é considerada ideal

para a IFD para a TFD, pois apesar de apresentar uma banda de absorção mais intensa na região do azul (400 nm), o mesmo também tem uma banda de absorção bem definida no região de 600 a 800 nm, janela óptica da IFD, como apresentado na Figura 11.

Figura 11 - Espectro de absorção e estrutura química da clorofilina cúprica de sódio.



Fonte: Caires (2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar a atividade fotossensibilizadora do composto eosina azul de metileno (Giemsa) e clorofilina cúprica de sódio (E-141ii) no processo de inativação fotodinâmica de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes e susceptíveis à antibióticos.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial fotossensibilizador da eosina azul de metileno (Giemsa) no processo de inativação fotodinâmica de cepas de bactérias multirresistentes (*Staphylococcus aureus* MRSA e *Escherichia coli* mcr-1) e susceptíveis (*Staphylococcus aureus* ATCC e *Escherichia coli* ATCC) quando submetida à irradiação da luz vermelha.
- Determinar a capacidade fotossensibilizadora da clorofilina cúprica de sódio (E-141ii) em inativar, via processo fotodinâmico, cepas de bactérias multirresistentes (*Staphylococcus aureus* MRSA e *Escherichia coli* mcr-1) e susceptíveis (*Staphylococcus aureus* ATCC e *Escherichia coli* ATCC) quando irradiadas pela luz vermelha.
- Estabelecer um protocolo de fotoinativação a fim de estabelecer as concentrações de fotossensibilizadores (Giemsa e E-141ii) e dose de energia necessárias para inibir 100% do crescimento bacteriano via processo fotodinâmico.
- Determinar o coeficiente de partição octanol-água para inferir se os FSs possuem afinidades por membranas.
- Caracterizar o mecanismo de produção de espécies reativas de oxigênio pelos FSs com os objetivos de determinar se é o processo oxidativo é do Tipo I (geração de EROs) ou Tipo II (geração de $^1\text{O}_2$).
- Avaliar a morfologia das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, das cepas irradiadas e não irradiadas, por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4 METODOLOGIA

4.1 Equipamentos

4.1.1 Sistema LED

A irradiação foi feita utilizando um conjunto de LED's RGB, "home made", denominado de sistema de LED, com luz vermelha, com potência de 8.3 mW.cm^{-2} , por 1h ou 1h e 30 min a depender da cepa totalizando aproximadamente 30 J/cm^2 e 45 J/cm^2 de dose de energia, respectivamente.

4.2 Fotossensibilizador

Os corantes utilizados no presente estudo foram o eosina azul de metileno segundo Giemsa (Giemsa) ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{S}$) (Vetec Química- Rio de Janeiro, RJ) CAS: 51811-82-6, e clorofilina de cúprica de sódio (E141ii) grau comercial ($\text{C}_{34}\text{H}_{31}\text{CuN}_4\text{Na}_3\text{O}_6$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) CAS:11006-34-1.

4.2.1 Preparação dos fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores Giemsa e E-141ii foram pesados em balança analítica e colocados em recipientes estéreis, foi adicionada água destilada estéril para obter uma solução estoque, e a partir dessa solução, foram preparadas as concentrações utilizadas.

4.3 Bactérias

Para os ensaios biológicos foram utilizadas as cepas *Staphylococcus aureus* não resistente (ATCC 25923) e MRSA *mecA* positiva (Genbank número de acesso Mh087437) amostra cedida pelo Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Também foi utilizado cepa não resistente de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *E. coli mcr-1* positiva (CCBH 23595) cedida pelo Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). As cepas foram colocadas em Caldo Brain Heart Infusion (BHI) acrescidas de glicerol a 20% e mantidas em freezer.

4.3.1 Ensaio biológicos *in vitro*

As suspensões bacterianas foram preparadas a partir de estoque mantidos em freezer, um volume de 40 µL da suspensão estoque foi adicionada em 4 mL de caldo BHI, em seguida foi incubado a 37° C, em shaker da marca Marconi em agitação de 120 rpm (rotações por minuto) durante 24h. E a partir deste meio com inóculo foi retirado à quantidade necessária para se obter uma turvação semelhante a de 0,5 da escala de McFarland, que equivale a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, num total de 2 mL de solução contendo: salina inóculo e FS.

4.3.2 Determinação da inibição do crescimento bacteriano

Para a determinação da inibição bacteriana, os inóculos foram divididos em dois grupos: (i) um que ficou protegido da luz em temperatura ambiente, envolto em papel alumínio; e (ii) outro grupo que recebeu irradiação por 1 hora e 1h e 30 min, a depender da cepa.

Na solução de 2 mL de salina mais inóculo foram adicionadas as proporções de corante GIEMSA e E-141ii necessárias para que se obtivesse as concentrações de 1,0; 2,5; 5; 10; e 20 µM para *S. aureus* ATCC e *S. aureus* MRSA, já para *E. coli* ATCC e *E. coli* mcr-1 positiva foram preparadas as concentrações de 5; 10; 20; 40; e 50 µM.

Para os testes com *Staphylococcus aureus* ATCC e MRSA o tempo de incubação foi de 30 minutos, sendo preparada em tubos de ensaio e envolto em papel alumínio, em seguida colocada em agitador (Marconi) ajustado para 120 rpm. No caso da *Escherichia coli* ATCC e mcr-1 para o processo de internalização do corante foi acrescentado DMSO a 5% (v/v) e colocado em agitação por 2 h.

Após a agitação, 200 µL foram retirados e colocados em microplaca de 96 poços, para cada concentração, e realizada a irradiação, após isso foi realizada diluição seriada para ambos os grupos, irradiado e escuro, utilizando a diluição de 1:32 para plaqueamento e contagem, onde de cada poço foi retirado 1 µL e semeado em placa contendo meio PCA. Posteriormente, foi feito o espalhamento e a placa permaneceu em estufa a 37 °C por 18 h. Todas as concentrações foram feitas em duplicata, e o experimento repetido em pelo menos em outras duas ocasiões.

4.3.3 Análise estatística dos testes de inibição bacteriana

A determinação da média e o erro padrão (SE) da média foi feita a partir dos resultados obtidos dos testes de inibição bacteriana realizados em duplicata, por meio do programa ORIGIN 8.5.

4.4 Determinação do coeficiente de partição

A fim de se obter um maior entendimento sobre o potencial de interação do FS com membranas, que está relacionada com a partição do FS, foi realizado a determinação do coeficiente de partição água/n-butanol. Para tal análise foi utilizado o método shake-flask. O parâmetro utilizado foi Log $P_{O/W}$, pois este tem sido usado como avaliação da lipofilicidade de um composto, ou de sua afinidade por membrana. Compostos com Log $P_{O/W}$ positivo são considerados de caráter lipofílico e certamente têm grande afinidade por membranas (ALONSO, 2014).

Como ocorre uma pequena penetração da água no butanol e do butanol na água, um frasco contendo 50% (v/v), de água destilada e n-butanol foi agitado por 24 h em um agitador magnético, para promover a saturação das soluções. Após 24h foi colocado em funil de separação a mistura água/N-butanol 50% (v/v), e obteve-se água saturada com butanol (água/butanol) e n-butanol saturado com água (n-butanol/água), adicionou-se o FS (10 mg L⁻¹). Posterior a agitação vigorosa no vórtex por 2 minutos, a solução contendo 50% (v/v) de água/butanol e 50% (v/v) n-butanol/água contendo o FS permaneceu no escuro em funil de separação, para se alcançar o equilíbrio e, conseqüente, separação da fase aquosa e orgânica. Em seguida foram coletadas alíquotas de cada fase e feitas as medidas em espectrofotômetro de absorção UV-Vis para determinar a concentração do FS em cada fase assim como descrito por Engelmann *et al.*, (2007).

Para os cálculos de coeficiente de partição foi utilizada a Equação 1, onde o C_B é a absorção do composto no butanol, o C_W é absorção do composto na água, V_B é o volume de n-Butanol e V_W é o volume da água.

$$P_{B/W} = \frac{C_B}{C_W} \times \frac{V_W}{V_B} \quad \text{Equação 1}$$

Para converter o $\text{Log } P_{B/W}$ para o sistema octanol/água ($\text{Log } P_{O/W}$) foi utilizada a equação $\text{Log } P_{O/W} = (1,55 \times \text{Log } P_{B/W}) - 0,54$ como descrito por Engelmann e colaboradores (2007).

4.5 Caracterização da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Para se investigar quais os mecanismos de indução da morte celular via processo fotodinâmico, foram utilizados os marcadores dihydroethidium (DHE) e 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) para determinar, respectivamente, se os FSs poderiam induzir morte celular via mecanismo Tipo I (produção de EROs) e Tipo II (produção de oxigênio singlete).

O DPBF é utilizado para investigar a presença de Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), pois na presença do $^1\text{O}_2$ o DPBF se decompõe formando 1,2-dibenzoylbenzene. Em virtude dessa decomposição, é possível mensurar a diminuição da absorbância do DPBF e relacionar com a produção de $^1\text{O}_2$, (CARLONI, *et al.*, 1993).

Para o experimento que determinou a geração de $^1\text{O}_2$, utilizou-se uma solução contendo 0,4 mL de FS (E-141ii ou GIEMSA) à 30 μM , 0,2 mL de DPBF (solução estoque em concentração de 1mM) e 2 mL de DMSO (obtendo-se uma solução final de 2,6 mL colocada numa cubeta de quartzo). A irradiação foi realizada com um LED vermelho (625 nm) irradiando diretamente a cubeta com uma potência de 3,5 mW. A produção de $^1\text{O}_2$ (degradação do DPBF) foi monitoramento pela redução da absorbância, no comprimento de onda de 415 nm, em função do tempo de irradiação. As medidas de absorção UV-Vis foram realizadas com o auxílio de um espectrofotômetro LAMBDA 265 UV/Vis (Perkin Elmer) no Laboratório de Óptica e Fotônica do Instituto de Física da UFMS, procedimento que foi adaptado de PIVETTA, *et al.*, (2017).

Para a determinação da produção de EROs e identificar o fotoproceto do tipo I, foi utilizado um marcador conhecido e usado para esse fim, o DHE. Segundo Yazdani, 2015, essa sonda não fluorescente reage com superóxido ($\text{O}_2 \cdot^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito (ONOO^-), ácido hipocloroso (HOCl), gerando na presença desses EROs o 2-hydroxyethidium, um composto fluorescente com um pico de emissão em torno de 610 nm, quando excitado em 500 nm. De acordo com Ziolonka, 2010, o DHE não reage com $^1\text{O}_2$. Portanto, é possível acompanhar o aumento a produção de EROs a partir da emissão de fluorescência das espécies geradas.

No experimento de produção de EROS, foi utilizado 2 mL de E-141ii na concentração de 30 μ M em DMSO e 4 μ L de DHE (em concentração inicial de 5 mM). A irradiação foi realizada com um LED vermelho (625 nm) irradiando a cubeta diretamente com uma potência 12 mW. Para o Giemsa foram utilizadas as mesmas concentrações de FS e DHE, entretanto, a irradiação foi realizada com uma potência de 3,5 mW. A geração de EROs (determinada a partir do surgimento do 2-hydroxyethidium) foi monitoramento pelo aumento da intensidade de fluorescência entre 400 e 750 nm, quando excitada em 500 nm, em função do tempo de irradiação. As medidas de fluorescência foram realizadas com o auxílio de um espectrofluorímetro FluoroMate FS-2, (Scinco) no Laboratório de Óptica e Fotônica do Instituto de Física da UFMS.

4.6 Preparação das amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A preparação das amostras foi realizada de acordo com o item 4.3.2 utilizando as cepas sensíveis a antibióticos para *S. aureus* ATCC na concentração de 20 μ M e para *E. coli* ATCC na concentração 50 μ M para ambos os FSs testados.

A preparação dessas bactérias para visualização no MEV consistiu em fixá-las desidratando em etanol, fazer a secagem em ponto crítico e posteriormente revestir com ouro para que as mesmas possam ser visualizadas (KALÁB, M.; YANG, A.; CHABOT, D., 2008).

Assim as amostras submetidas a IFD e mantidas no escuro foram colocadas em microtubos de centrifugação e foi adicionado 1 mL tampão fosfato com glutaraldeído a 2,5% por um período de 3h. Em seguida a amostra foi centrifugada por 5min a 1000 rpm e retirado 1 mL, e em seguida adicionado 1mLde tampão fosfato, repetindo esse processo por 3 vezes.

A desidratação foi realizada com etanol 25%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%, retirando 1 mL tampão fosfato e em seguida adicionando 1mL de etanol iniciando com etanol a 25%, onde a amostra permanecia por 5 min até ser centrifugada a 1000 rpm, então 1 mL era retirado e a nova concentração de etanol era colocada passando pelo mesmo processo até chegar na concentração de etanol 100%.

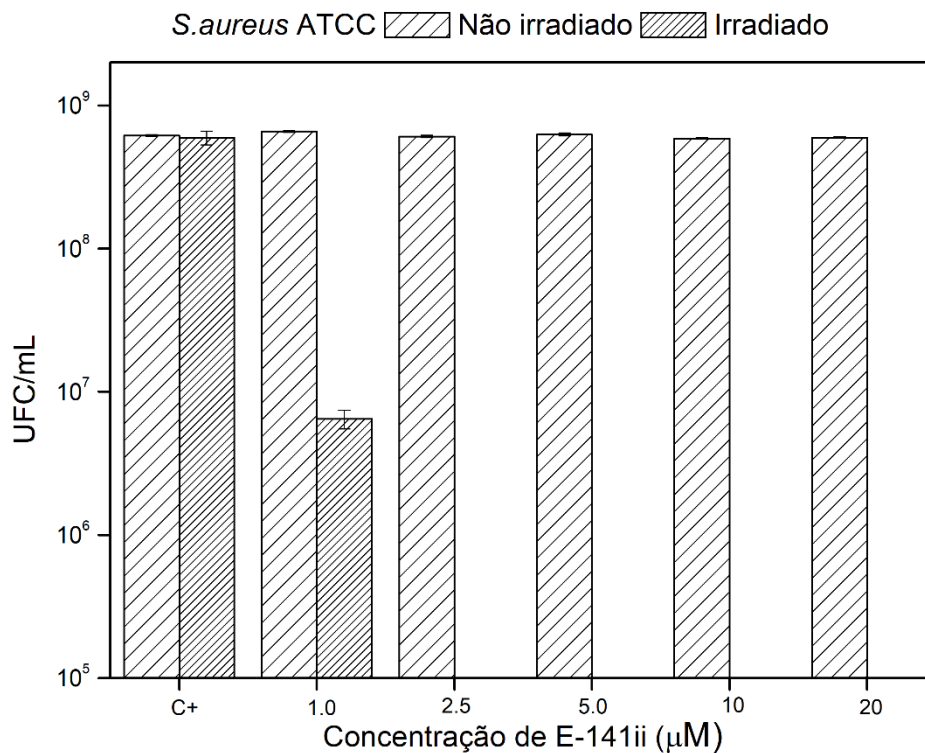
As amostras foram então depositadas em superfície de vidro 8mm x 8mm, onde ficaram 24h em temperatura ambiente para secagem e fixação, em seguida foi realizada a secagem a ponto crítico. Por fim, elas foram revestidas com uma fina camada de ouro e anexadas em suporte usando fita de carbono condutiva. As imagens foram obtidas com as seguintes condições: 10 kV, tamanho do ponto 10 e uma distância de trabalho de 8 mm, as

análises foram realizadas em MEV JEOL modelo (JSM-6380LV) no laboratório de Nanomateriais e Nanotecnologia Aplicada (LNNA), do Instituto de Física da UFMS.

5 RESULTADOS

5.1 Inibição do crescimento bacteriano

Figura 12 - Unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus* ATCC em função da concentração de E-141ii.

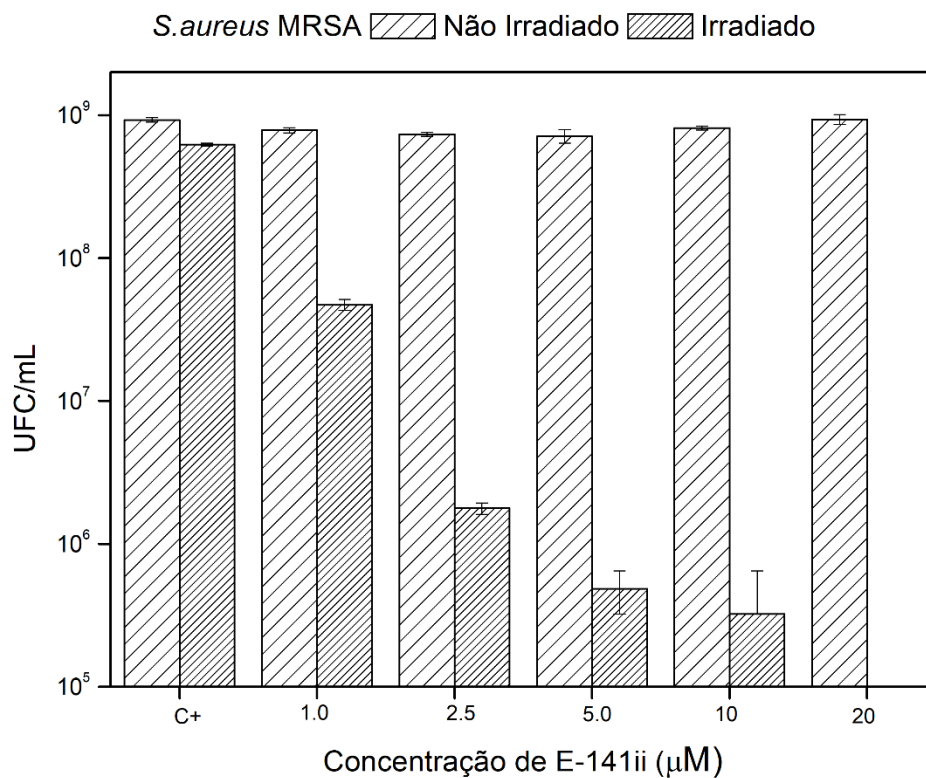


Fonte: O autor

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

Como observado na Figura 12, houve a inibição do crescimento bacteriano induzido pelo IFD em *S. aureus* utilizando a dose de 30 J/cm² no comprimento de onda de 625 nm. É possível observar que há uma diminuição significativa para a concentração de 1 μM, e inibição total do crescimento bacteriano com 2.5 μM. Imagens representativas das placas de petri, para os grupos controle e irradiados, estão apresentadas nas Figuras 14. Na figura 13 logo abaixo é possível observar a inibição do crescimento bacteriano induzido pelo IFD em *S. aureus* MRSA.

Figura 13 - Unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus* MRSA em função da concentração de E-141ii.



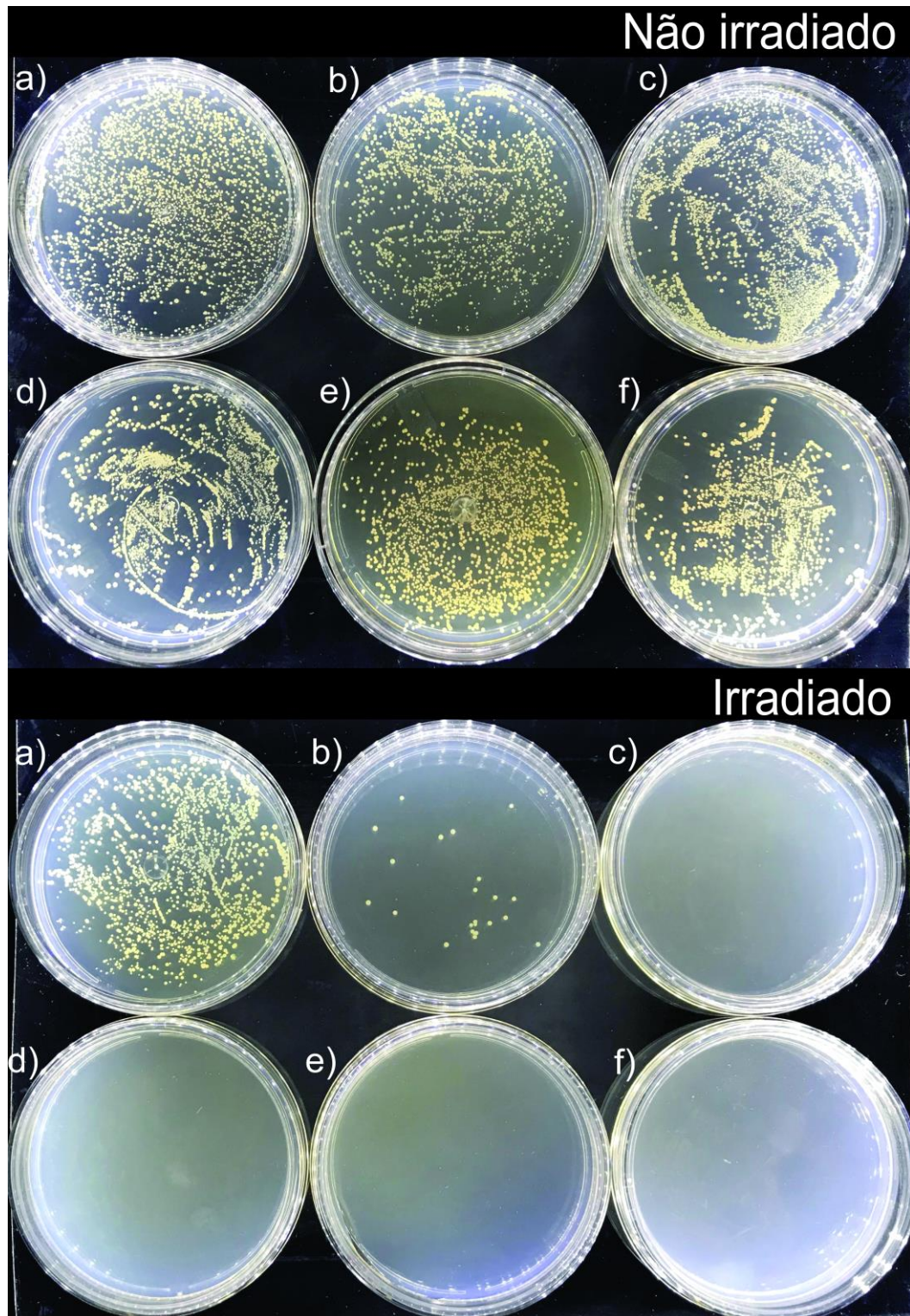
Fonte: O autor.

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

A inibição do crescimento bacteriano induzido pelo IFD em *S. aureus* MRSA demonstrou-se bem-sucedida, como mostra a Figura 13. O efeito da fotoinativação utilizando uma dose de 30 J/cm² no comprimento de onda de 625 nm induziu uma diminuição significativa nas concentrações de 1 μM, 2.5 μM, 5.0 μM e 10 μM, ocorrendo a inibição total do crescimento bacteriano com 20 μM. As imagens das placas de petri para os grupos controle e irradiados estão mostradas na Figura 15.

Apesar dos bons resultados em *S. aureus*, o corante E141ii não apresentou nenhum efeito de fotoinativação com a *E. coli*, mesmo com maior tempo de incubação de 4h e do aumento da porcentagem do agente permeador de membrana DMSO de 5% para 10% e aumento da concentração do FS 50 μM, 100 μM e 150 μM (dados não apresentados).

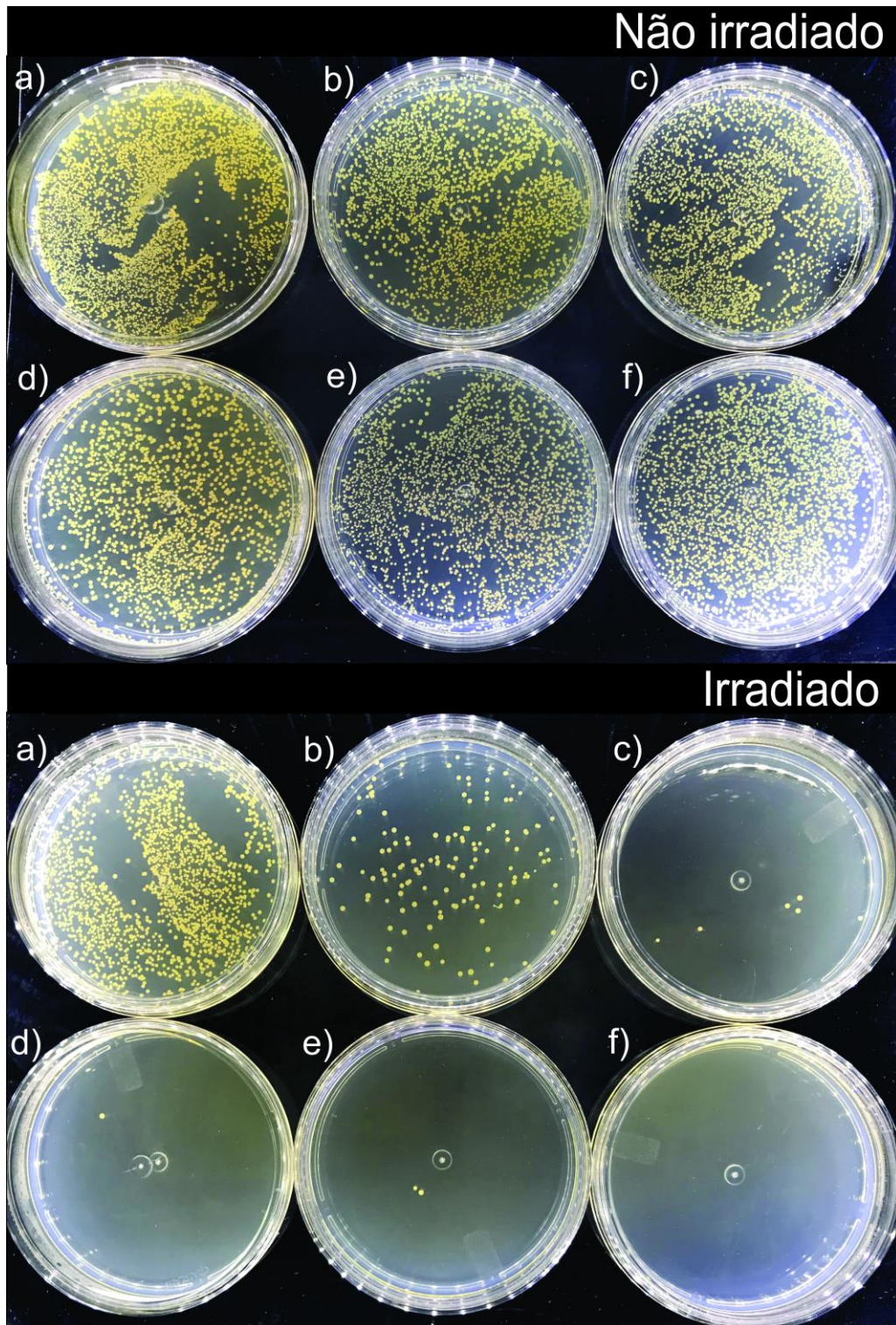
Figura 14 - Imagem das placas de Petri contendo as unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus* ATCC para as diferentes concentrações de E-141ii.



Fonte: O autor.

Nota: Onde (a) zero; (b) 1,0 μ M; (c) 2,5 μ M; (d) 5 μ M; (e) 10 μ M; e (f) 20 μ M. O crescimento bacteriano foi determinado após 18 h de incubação.

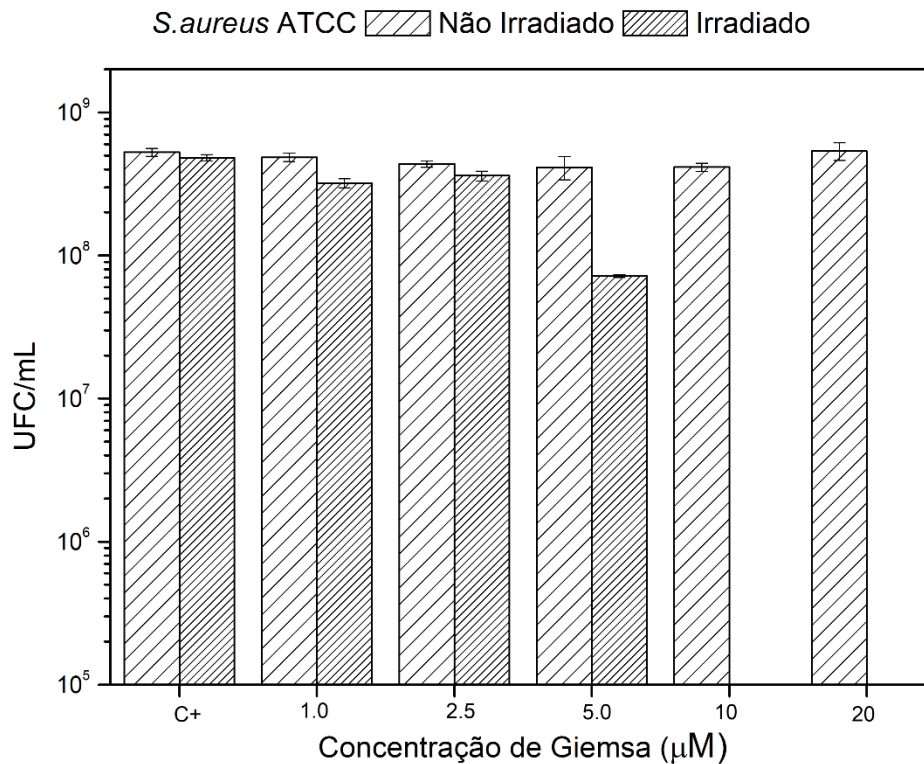
Figura 15 - Imagem das placas de Petri contendo as unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus* MRSA para as diferentes concentrações de E-141ii.



Fonte: O autor

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

Figura 16 - Unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus* ATCC em função da concentração de Giemsa.

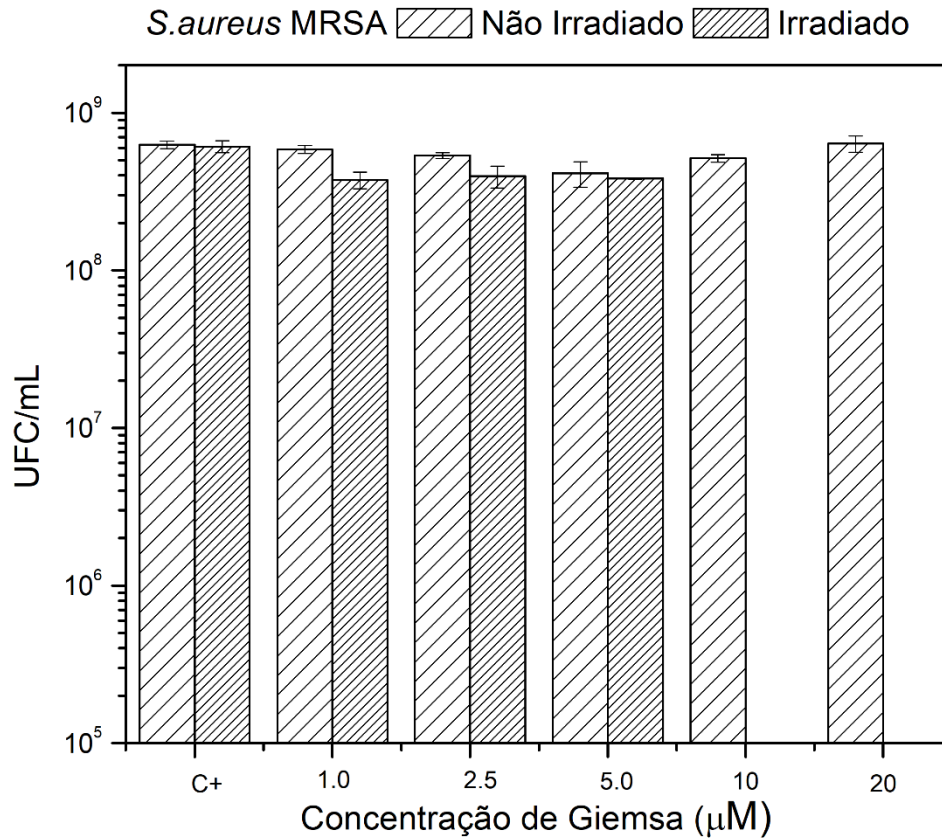


Fonte: O autor.

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

A inibição do crescimento bacteriano induzido pelo IFD em *S. aureus* ATCC demonstrou-se eficiente, utilizando Giemsa com dose de energia de 30 J/cm² no comprimento de onda de 625 nm, onde é possível observar uma diminuição de UFC/mL para a concentração de 5 µM, e a inibição total do crescimento bacteriano com 10 µM. As imagens das placas de petri para os grupos controle e irradiados estão demonstrados na Figura 18. Na Figura 17 é possível observar a inibição do crescimento bacteriano induzido pelo IFD em *S. aureus* MRSA utilizando Giemsa como fotossensibilizador.

Figura 17 - Unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus* MRSA em função da concentração de GIEMSA.

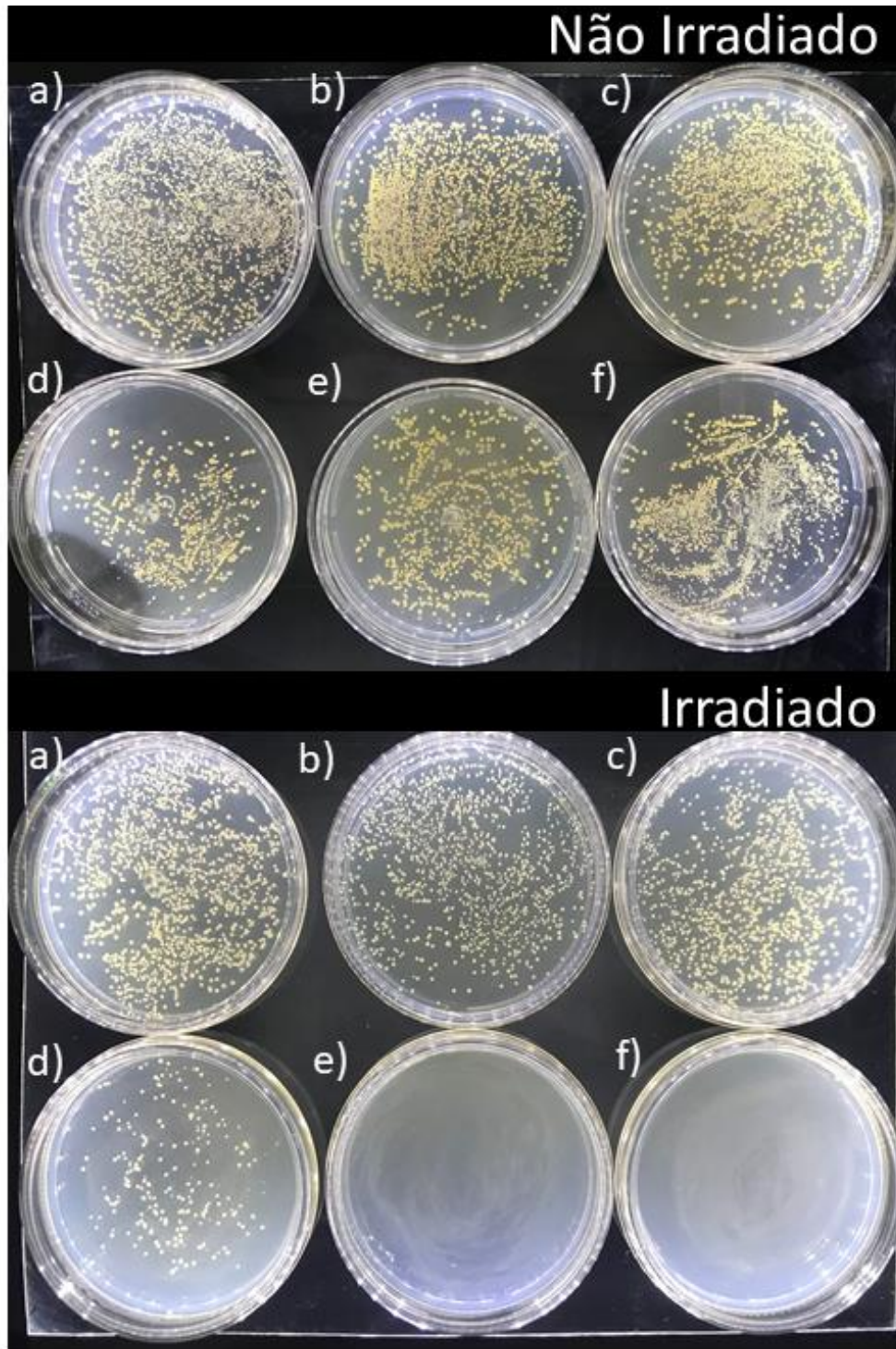


Fonte: O autor.

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

A inibição do crescimento bacteriano induzido pelo IFD em *S. aureus* MRSA demonstrou-se eficiente com o GIEMSA, quando submetido a luz vermelha (625 nm) com a dose de energia de 30 J/cm^2 , onde a inibição total do crescimento bacteriano é visualizada na concentração de $10 \mu\text{M}$. As imagens representativas das placas de petri para a fotoinativação observada e para o grupo controle estão mostradas na Figuras 19.

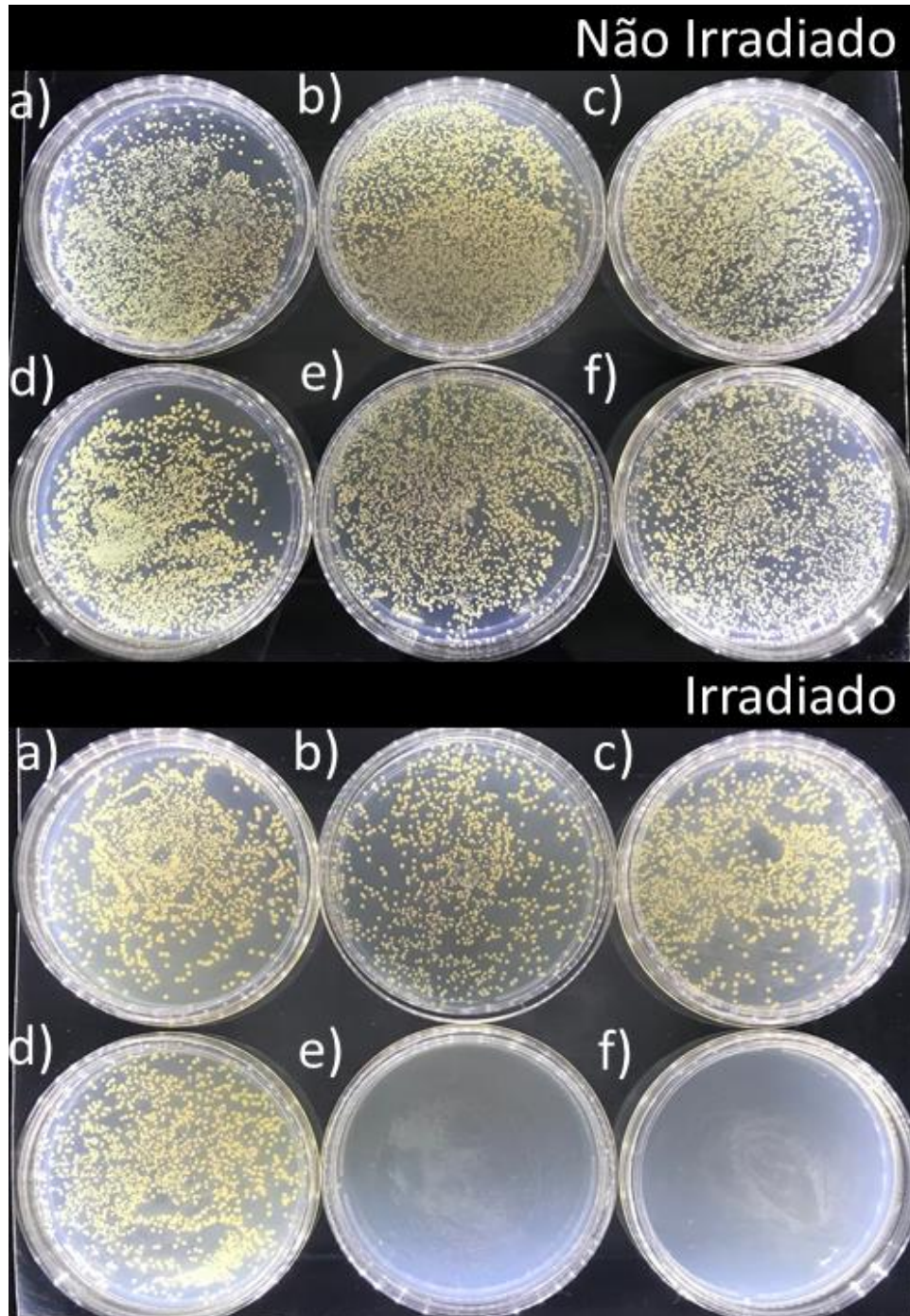
Figura 18 - Imagem das placas de Petri contendo as unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus* ATCC para as diferentes concentrações de GIEMSA.



Fonte: O autor.

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

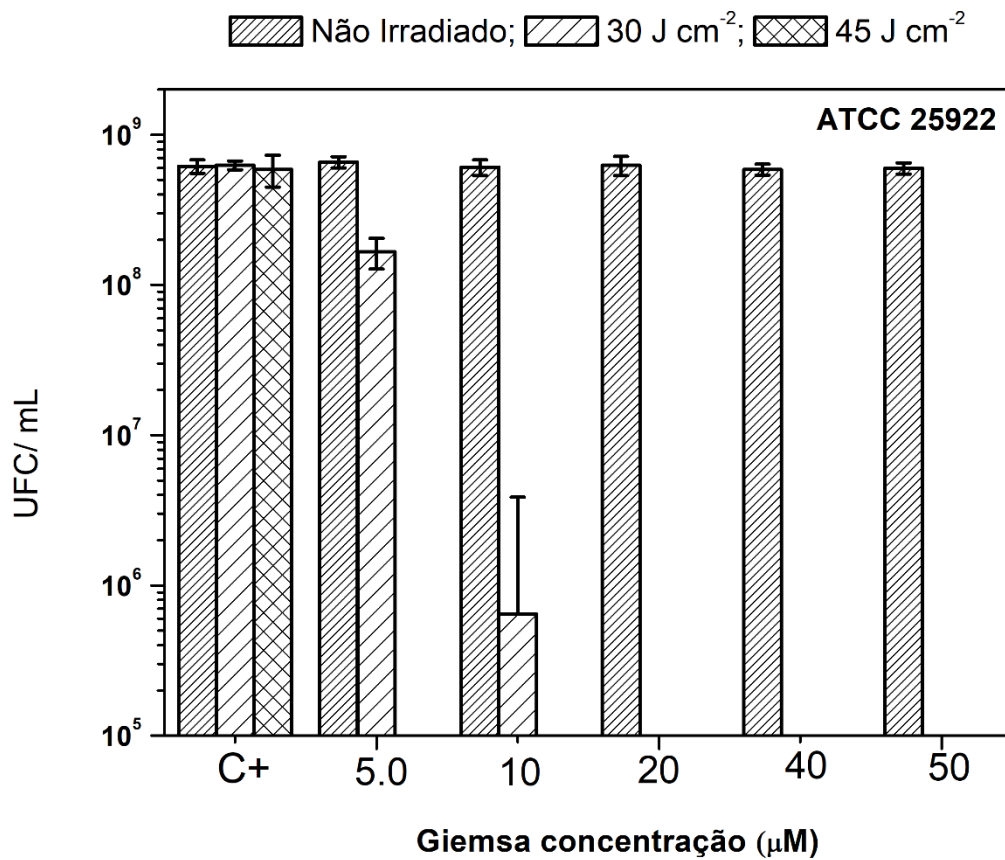
Figura 19 - Imagem das placas de Petri contendo as unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus* MRSA para as diferentes concentrações de GIEMSA.



Fonte: O autor.

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

Figura 20 - Unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli* ATCC em função da concentração de GIEMSA.

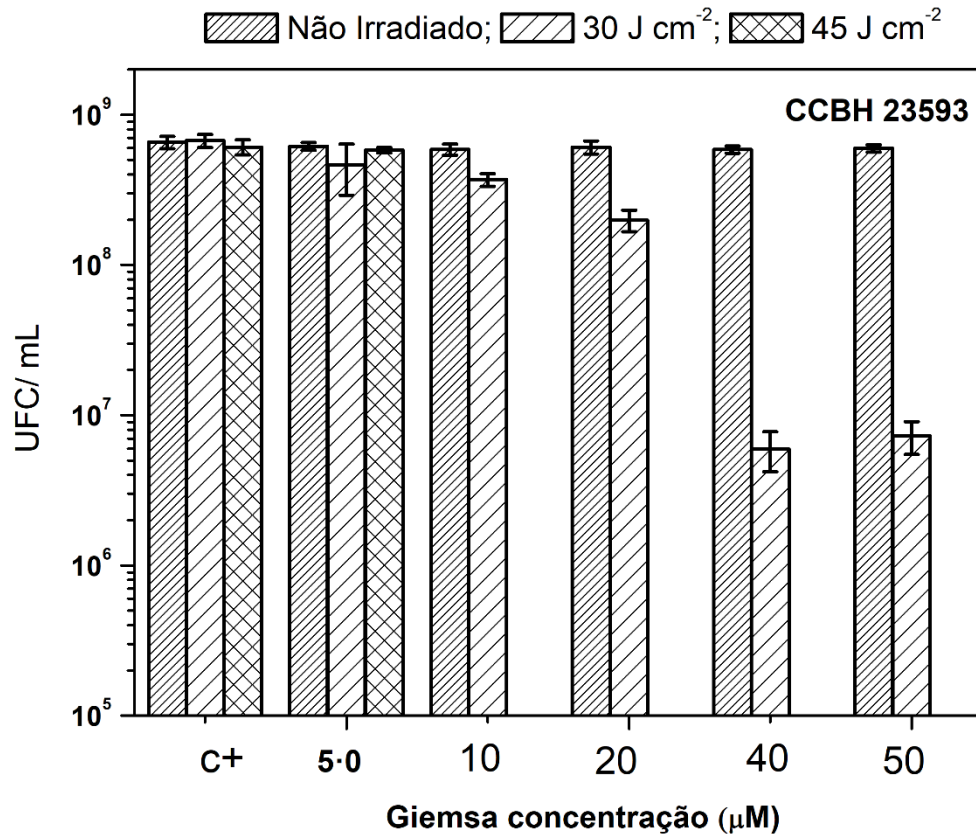


Fonte: O autor.

Nota: O crescimento bacteriano foi determinado após 18h de incubação. O grupo irradiado foi submetido a uma dose de energia de 30 J/cm² e 45 J/cm², utilizando luz vermelha (625 nm).

O crescimento bacteriano foi inibido induzido pelo processo de IFD em *E. coli* ATCC demonstrando sua eficiência, utilizando GIEMSA com dose de energia de 30 J/cm² e 45 J/cm² no comprimento de onda de 625 nm, é possível observar uma diminuição da população bacteriana na concentração de 5 µM e 10 µM, e inibição total do crescimento bacteriano com 20 µM com dose de energia de 30 J/cm², e total inibição do crescimento com concentração de 5 µM utilizando 45 J/cm². As imagens das placas de petri, para os grupos controle e irradiados estão demonstrados na Figura 22.

Figura 21 - Unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli mcr-1* positiva em função da concentração de GIEMSA.

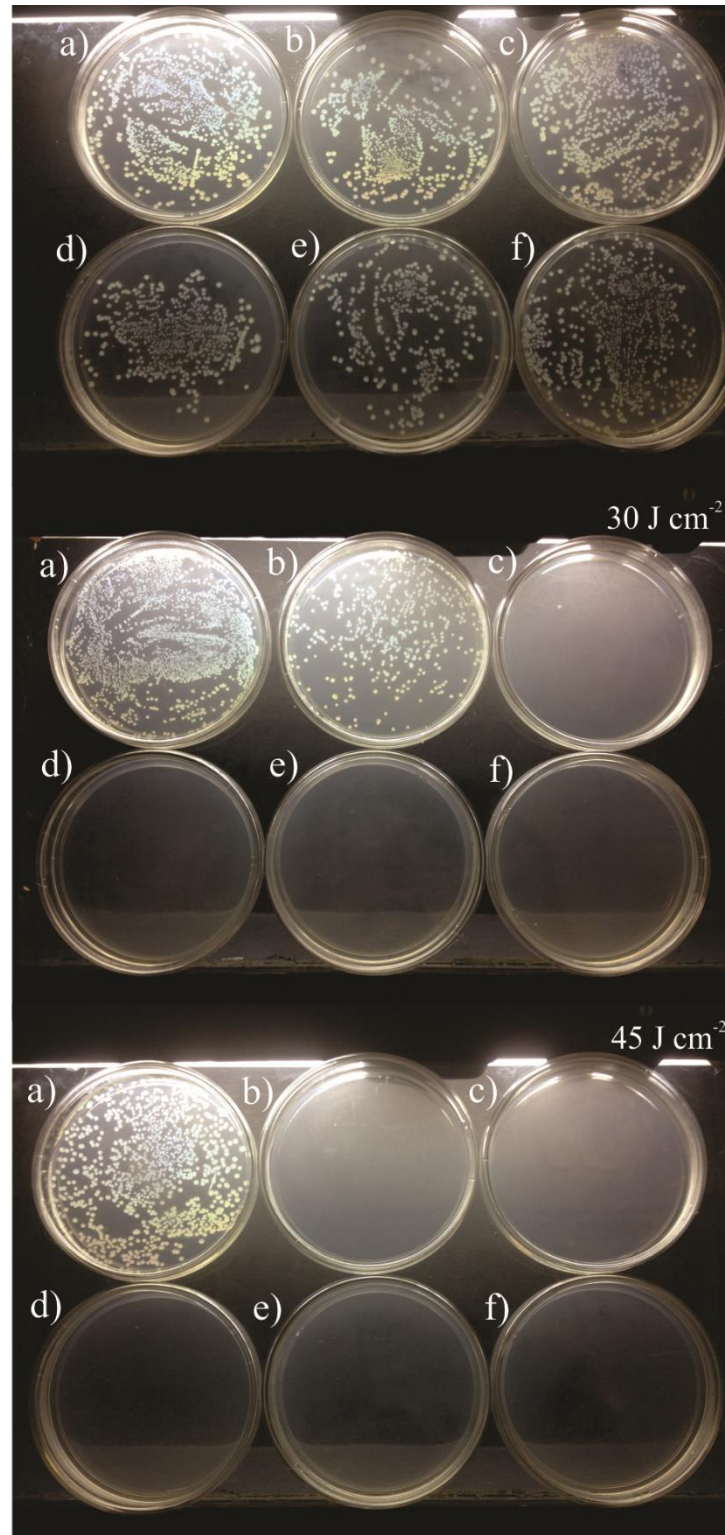


Fonte: O autor.

Nota: O crescimento bacteriano foi determinado após 18h de incubação. O grupo irradiado foi submetido a uma dose de energia de 30 J/cm² e 45 J/cm², utilizando luz vermelha (625 nm).

A inibição do crescimento bacteriano induzido pelo IFD em *E. coli mcr-1* positiva demonstrou-se eficiente, utilizando GIEMSA com dose de energia de 45 J/cm² no comprimento de onda de 625 nm, é possível observar uma diminuição da população bacteriana na concentração de 20 µM, 40 µM e 50 µM para dose de energia de 30 J/cm², porém não foi observado dose letal para as concentrações utilizadas, a e inibição total do crescimento bacteriano foi observado na concentração de 10 µM, com dose de energia de 45 J/cm². As imagens das placas de petri, para os grupos controle e irradiados estão demonstrados na Figura 23.

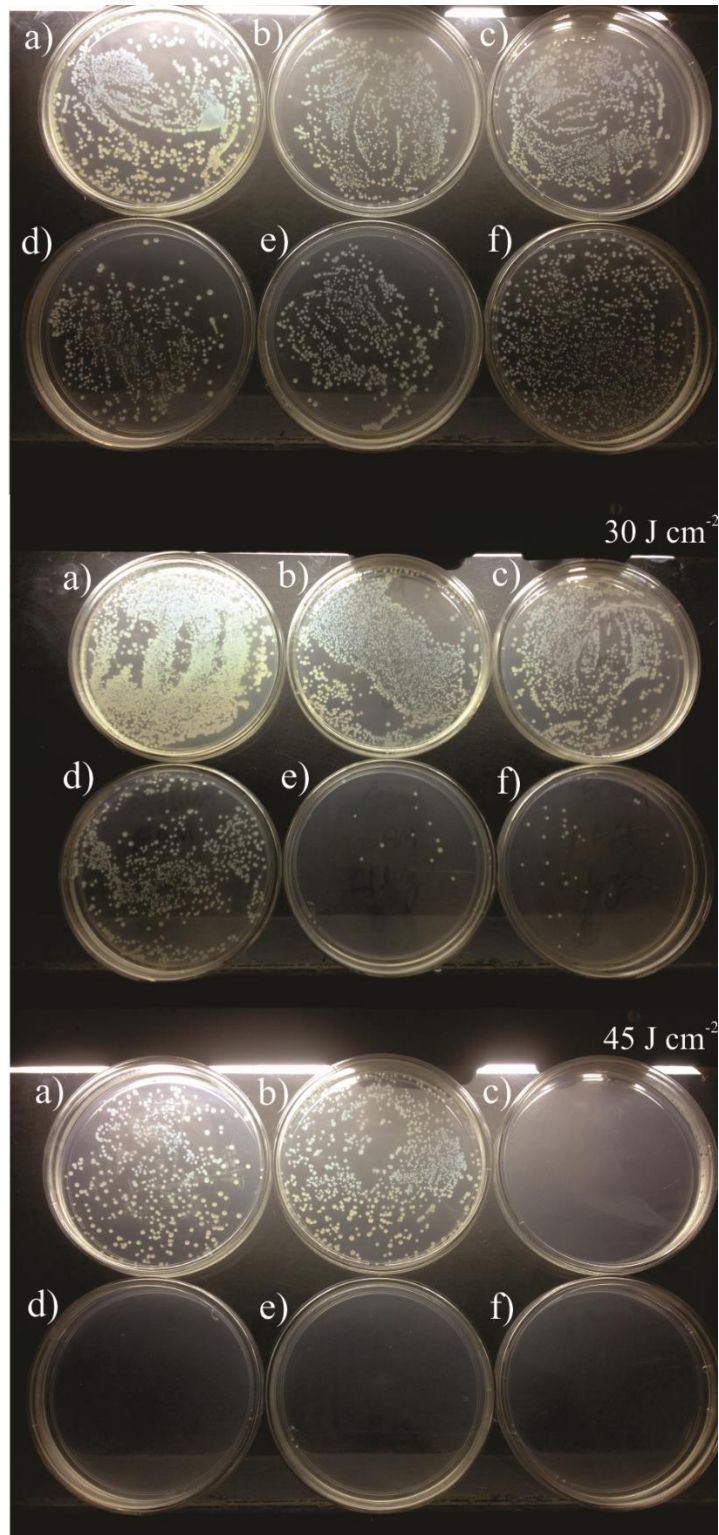
Figura 22 - Imagem das placas de Peteri das UFC de *Escherichia coli* ATCC utilizando GIEMSA.



Fonte: O autor

Nota: Onde (A) zero; (B) 5,0 μM ; (C) 10 μM ; (D) 20 μM ; (E) 40 μM ; e (F) 50 μM . O crescimento bacteriano foi determinado após 18 h de incubação.

Figura 23 - Imagem das placas de Peteri das UFC de *Escherichia coli mcr-1* positiva utilizando GIEMSA.



Fonte: O autor

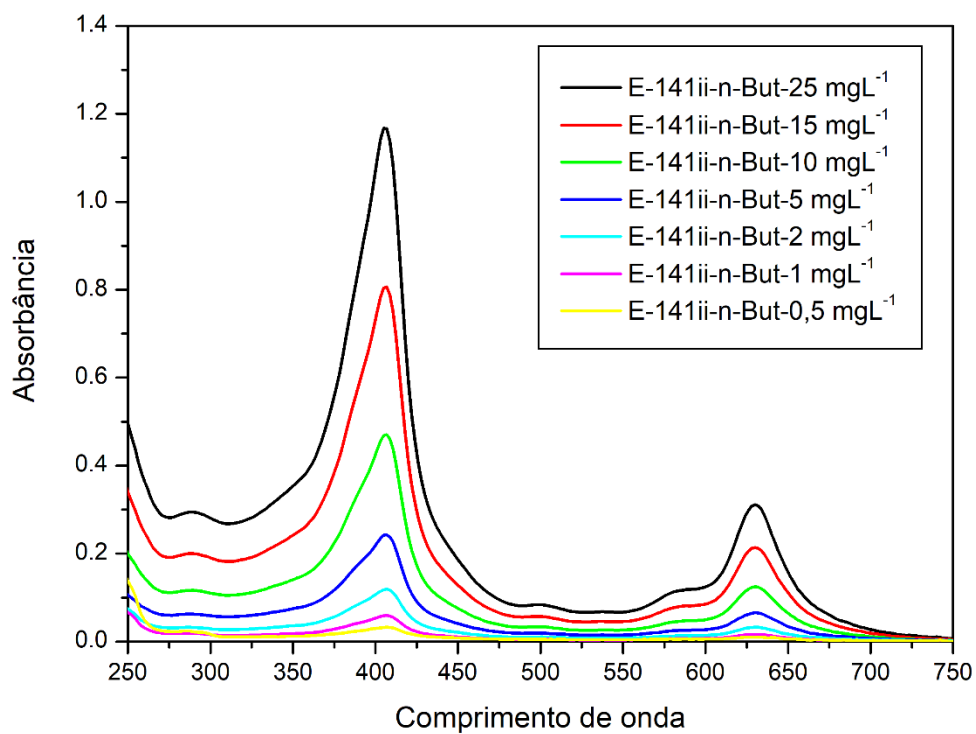
Nota: Onde (A) zero; (B) 5,0 μM; (C) 10 μM; (D) 20 μM; (E) 40 μM; e (F) 50 μM. O crescimento bacteriano foi determinado após 18 h de incubação.

5.2 Coeficiente de Partição

5.2.1 Coeficiente de Partição E-141ii

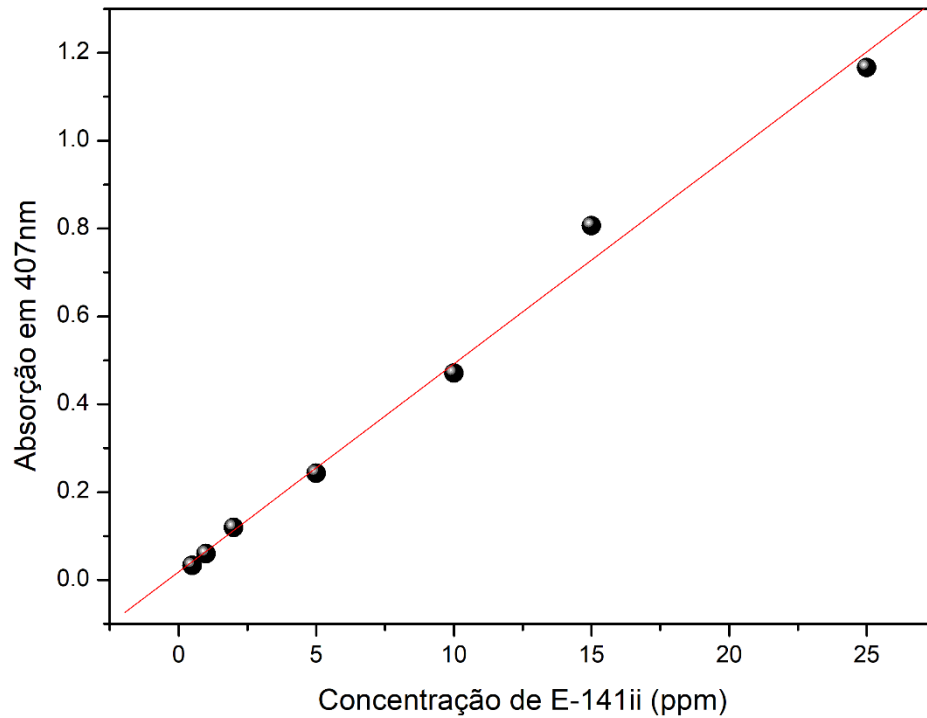
Para realizar os cálculos do coeficiente de partição foi necessário construir inicialmente uma curva de calibração, para que posteriormente fosse utilizada na quantificação do teor do FS na solução estudada. A figura 24 apresenta os espectros de absorvância para diferentes concentrações de E-141ii, a partir da qual a curva de calibração foi determinada. Para a construção da curva de calibração foi escolhido o máximo de absorção em 407 nm em função da concentração do FS na solução de n-butanol, como apresentado na figura 25.

Figura 24 - Espectros de absorção da E-141ii para diferentes concentrações.



Fonte: O autor

Figura 25 – Absorbância em 407 nm em função da concentração de E-141ii em n-Butanol; Curva de calibração para o cálculo de coeficiente de partição



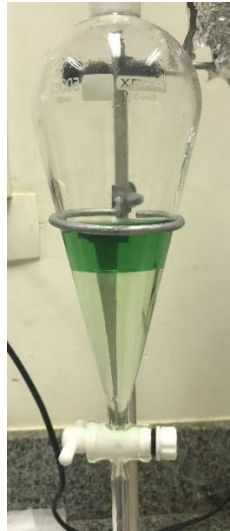
Fonte: O autor

Os resultados mostraram uma linearidade ($R^2 = 0,9963$) da absorbância versus concentração do FS, que é representado pela Equação 2. Onde A_{407} representa o valor da absorbância em 407 nm e C_{E141ii} a concentração de E-141ii em n-Butanol.

$$A_{407} = 0,018 + 0,047 \cdot C_{E141ii} \quad \text{Equação 2}$$

Para a determinação do coeficiente de partição o espectro de absorbância do E-141ii em n-Butanol foi obtido após a separação de fases, água-Butanol, como mostrado na Figura 27. A partir desse resultado, foi determinado uma concentração de $18,5 \text{ mg L}^{-1}$ de E-141ii na fase n-butanol (C_B). Conseqüentemente, a concentração de E-141ii na fase aquosa foi de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ (C_W). Esses valores nos dão $P_{\frac{B}{W}} = 18,5/1,5 = 12,3$. Essa maior afinidade do FS com n-Butanol pode ser observada visualmente como mostra a Figura 26.

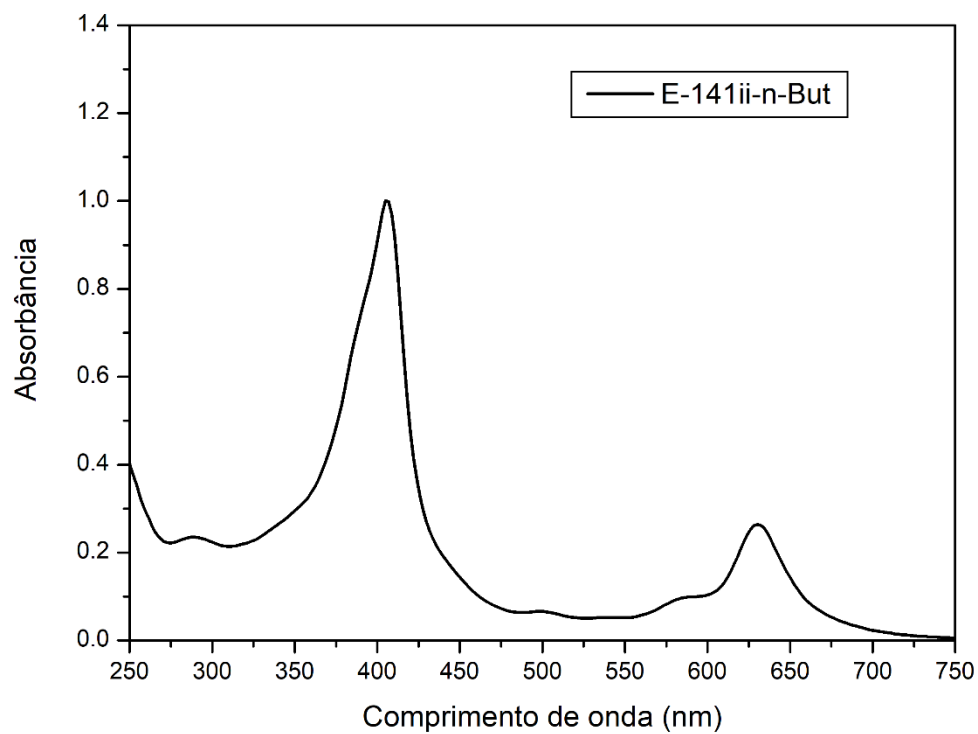
Figura 26 – Separação de fases água/n-Butanol para a E-141ii.



Fonte: O autor.

Portanto, esses valores de C_B e C_W resulta num $\text{Log } P_{\frac{B}{W}} = 1,09$. Como consequência, dado a relação apresentada existente entre $\text{Log } P_{O/W}$ e $\text{Log } P_{B/W}$ pela equação $\text{Log } P_{O/W} = (1,55 \times \text{Log } P_{B/W}) - 0,54$, o experimento de partição nos dá um valor de $\text{Log } P_{O/W} = 1,14$ para a E-141ii.

Figura 27 – Absorbância da E-141ii em n-Butanol após o experimento de partição.

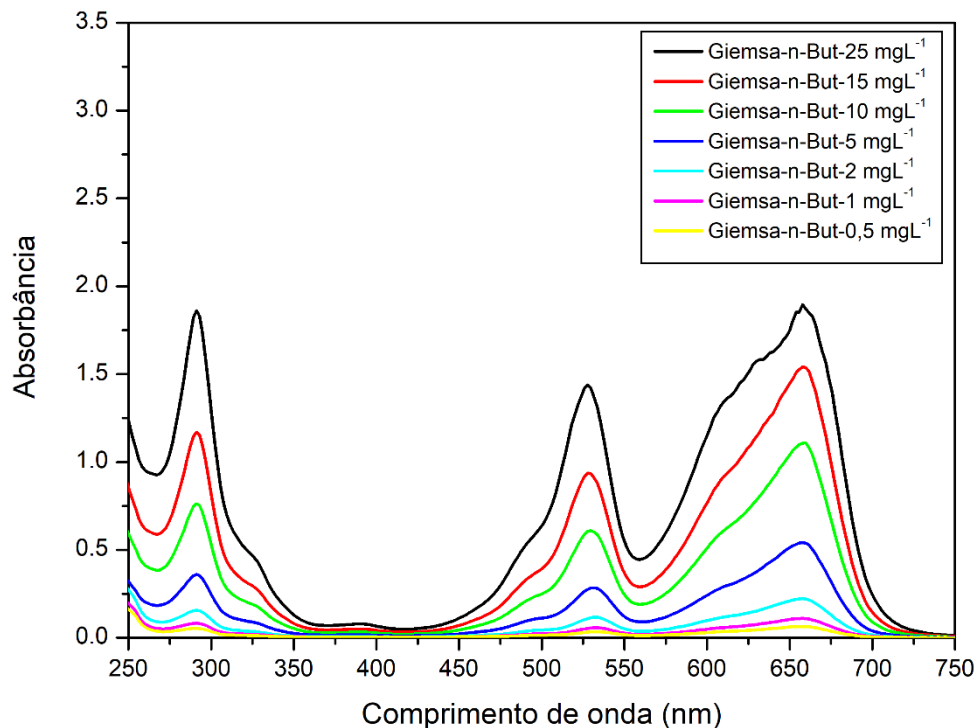


Fonte: O autor.

5.2.2 Coefficiente de Partição GIEMSA

Para realizar os cálculos do coeficiente de partição também foi necessário determinar inicialmente uma curva de calibração, para posteriormente utilizá-la para quantificar o teor do GIEMSA na solução n-butanol. A figura 28 apresenta os espectros de absorbância para diferentes concentrações de GIEMSA, a partir da qual a curva de calibração foi determinada.

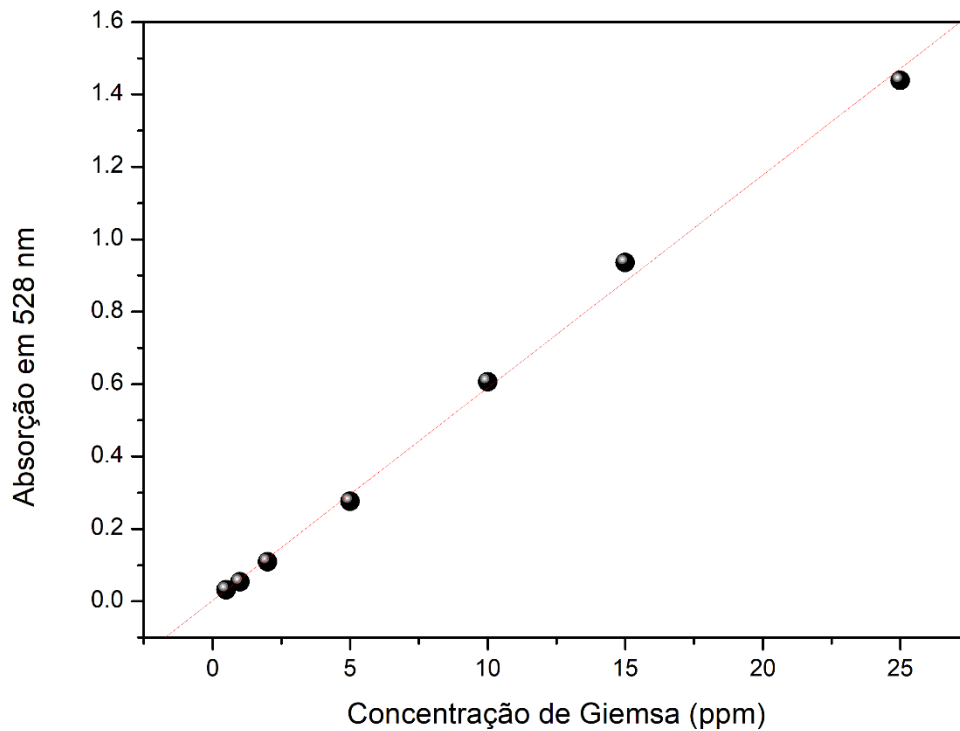
Figura 28 - Espectros de absorção do GIEMSA em função da concentração.



Fonte: O autor

Para a construção da curva de calibração foi escolhido o máximo de absorção em 528 nm em função da concentração do GIEMSA na solução de n-butanol, como apresentado na figura 29.

Figura 29 – Absorbância na banda 528 nm em função da concentração de GIEMSA; Curva de calibração do GIEMSA utilizada para o cálculo de coeficiente de partição



Fonte: O autor

Os resultados mostraram uma grande linearidade ($R^2 = 0,9986$) da absorbância versus concentração do GIEMSA, que é representado pela Equação 3. Onde A_{528} representa o valor da absorbância em 528 nm e C_{GIEMSA} a concentração de GIEMSA em n-Butanol.

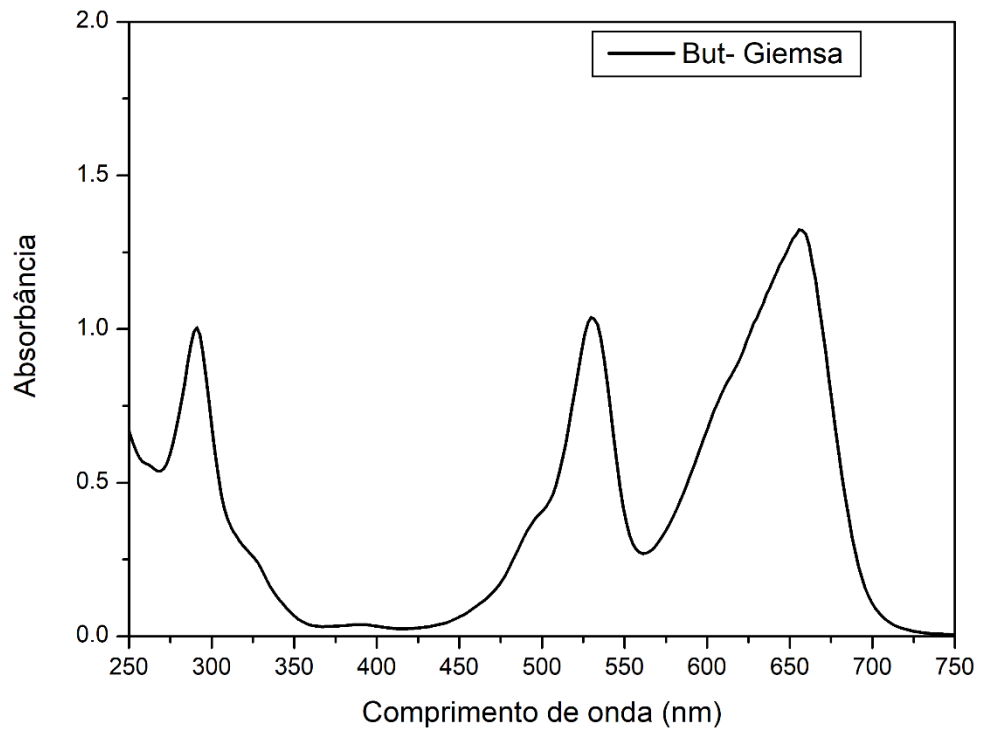
$$A_{528} = 0,002 + 0,059 \cdot C_{GIEMSA} \quad \text{Equação 3}$$

Para a determinação do coeficiente de partição o espectro de absorbância do GIEMSA em n-butanol foi obtido após a separação de fase água-butanol, como mostrado na figura 31. A partir desse resultado, foi determinado uma concentração de $17,5 \text{ mg L}^{-1}$ de GIEMSA na fase n-Butanol (C_B). Conseqüentemente, a concentração de GIEMSA na fase aquosa foi de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ (C_W). Esses valores nos dão um $P_{B/W} = 17,5/2,5 = 7$, resultando num $\text{Log } P_{B/W} = 0,85$ essa afinidade pela fase orgânica pode ser visualizada na figura 30. Portanto, dado a relação apresentada existente entre $\text{Log } P_{O/W}$ e $\text{Log } P_{B/W}$, pela equação $\text{Log } P_{O/W} = (1,55 \times \text{Log } P_{B/W}) - 0,54$, a partir do experimento de partição determinamos um valor de $\text{Log } P_{O/W} = 0,77$. **Figura**

30 – Separação de fases água/n-Butanol utilizando GIEMSA.

Fonte: O autor

Figura 31 - Concentração de GIEMSA no n-Butanol.



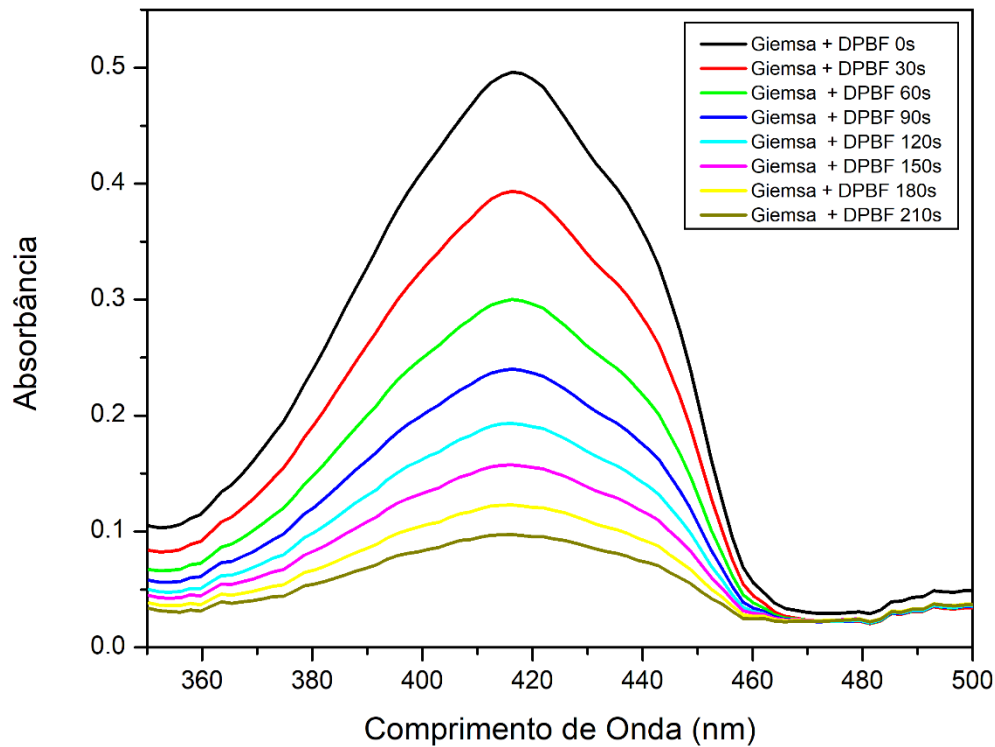
Fonte: O autor

5.3 Determinação da Produção de EROs

5.3.1 Geração de EROs pela GIEMSA

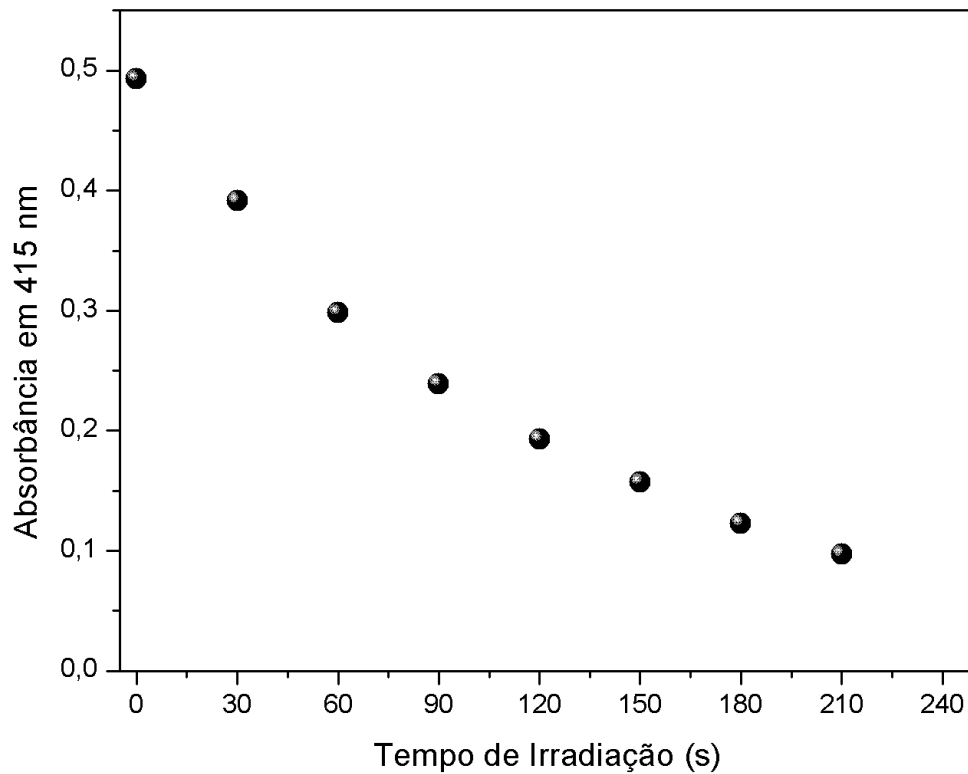
A figura 32 demonstra que há degradação do DPBF em função do tempo, como pode ser visto pela redução da banda de absorção em função do tempo, confirmando que há formação de $^1\text{O}_2$. A Figura 33 ilustra melhor a diminuição da absorção do DPBF em função do tempo. Portanto, esse resultado demonstra o excelente potencial da GIEMSA como fotossensibilizador via mecanismo Tipo II.

Figura 32 - Absorbância do GIEMSA e DPBF em função do tempo.



Fonte: O autor

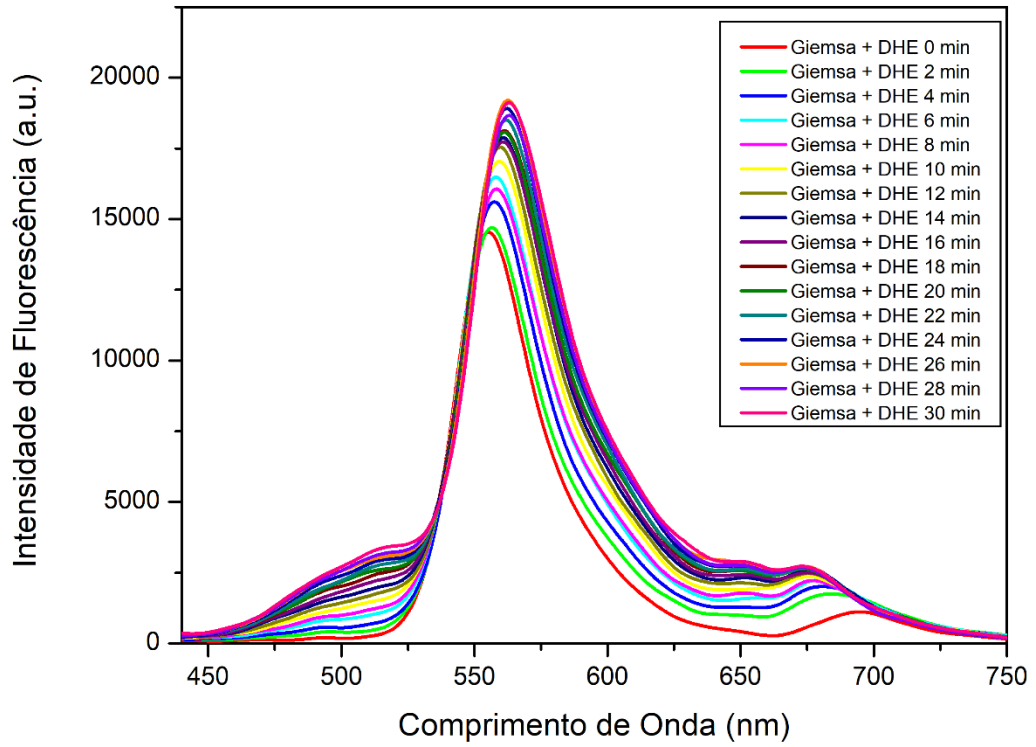
Figura 33 – Absorbância do GIEMSA em 415 nm em função do tempo.



Fonte: O autor

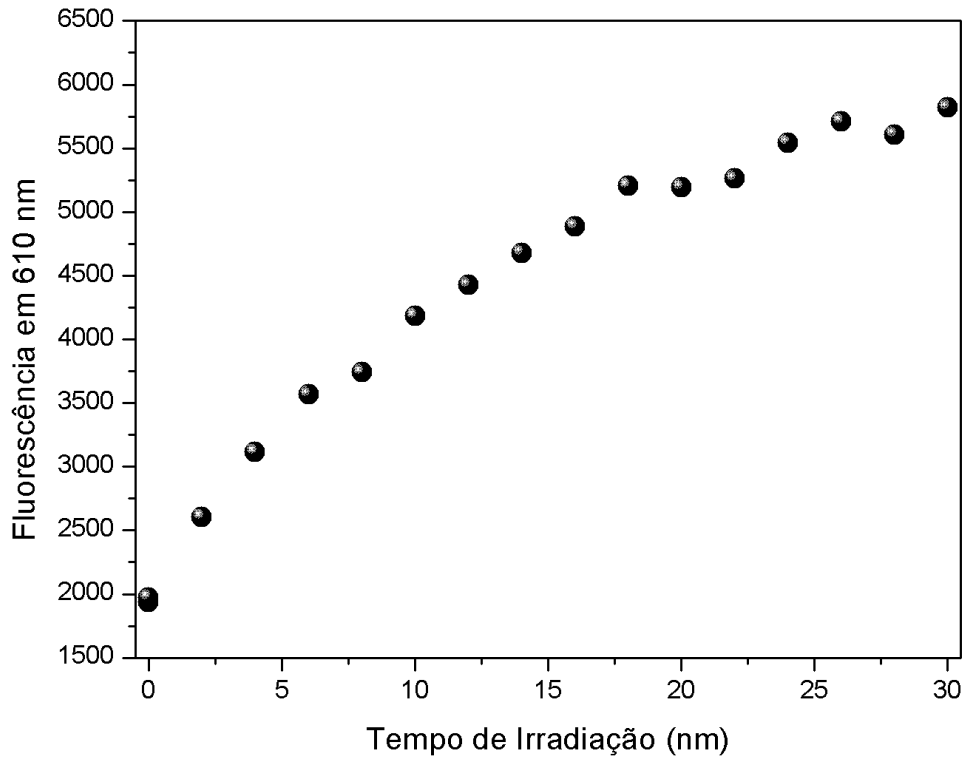
Além da produção de $^1\text{O}_2$, nossos resultados também demonstraram que o GIEMSA capaz de produzir EROs via mecanismo Tipo I. A Figura 34 mostra a formação de substância fluorescente durante o processo de irradiação, como é possível observar pelo aumento da fluorescência do composto em função do tempo. Esse resultado pode ser melhor visualizado acompanhado a emissão em 610 nm como mostrado na Figura 35, que pode estar associado ao aumento da produção do 2-hydroxyethidium em função do tempo.

Figura 34 - Fluorescência do GIEMSA e DHE em função do tempo.



Fonte: O autor

Figura 35 – Aumento da intensidade de fluorescência em função do tempo promovido pelo GIEMSA quando submetido a luz vermelha (610 nm) em função do tempo.

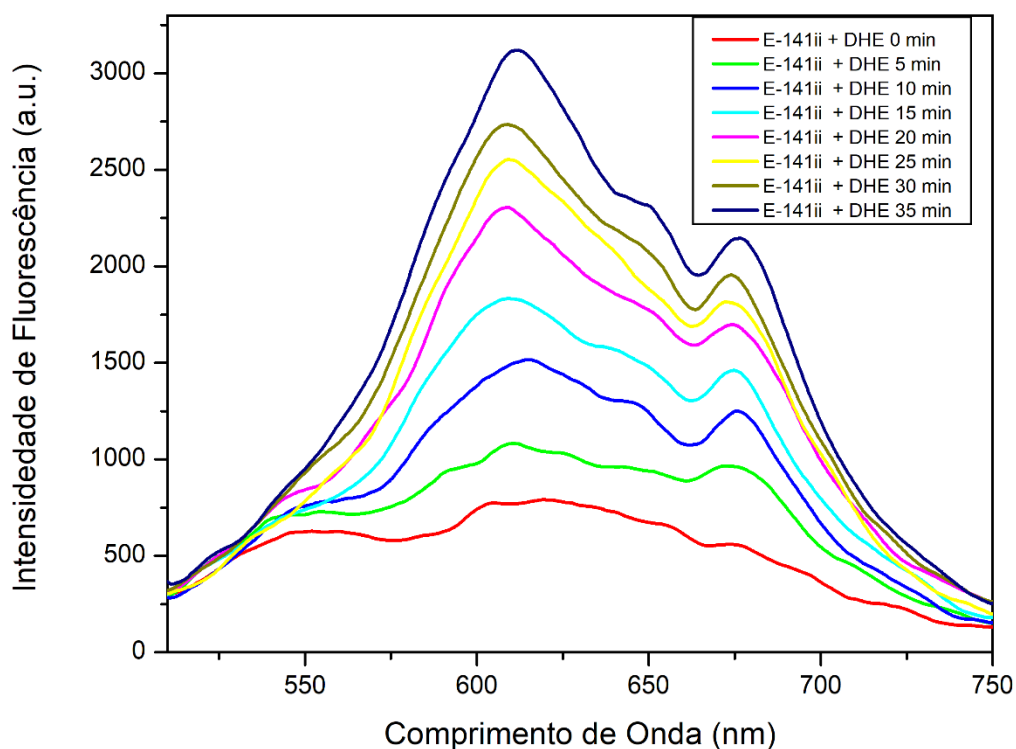


Fonte: O autor

5.3.2 Geração de EROs pela E141ii

A figura 36 mostra que há geração de ROS pela E-141ii, como pode ser observado pela formação de substância fluorescente e pelo aumento da fluorescência do composto em função do tempo.

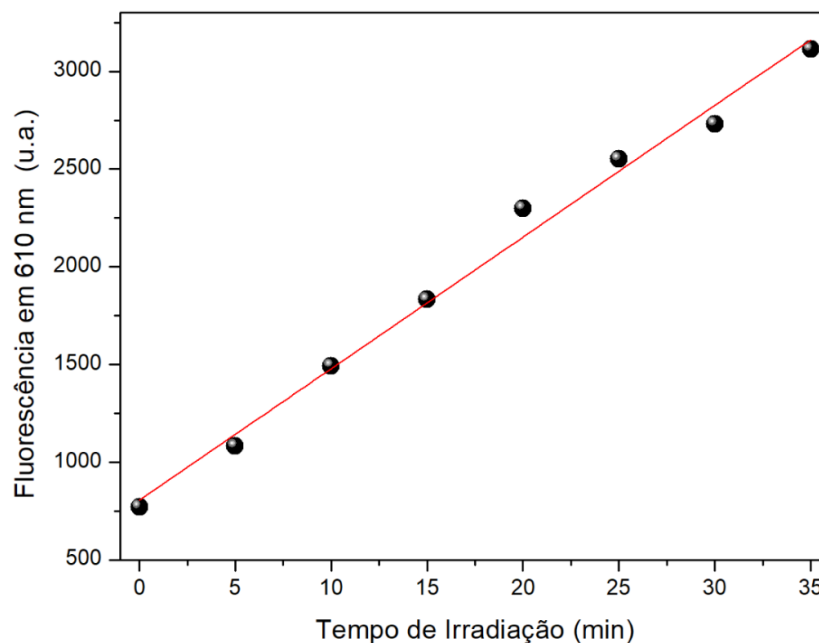
Figura 36 – Fluorescência da E-141ii e DHE em função do tempo.



Fonte: O autor

A partir da Figura 37, que mostra a emissão 610 nm em função do tempo de irradiação, fica mais fácil visualizar o aumento da produção de 2-hydroxyethidium como consequência da geração EROs pelo FS. Esse resultado demonstra o potencial da E-141ii como fotossensibilizador, capaz de induzir o processo fotodinâmico via mecanismo Tipo I.

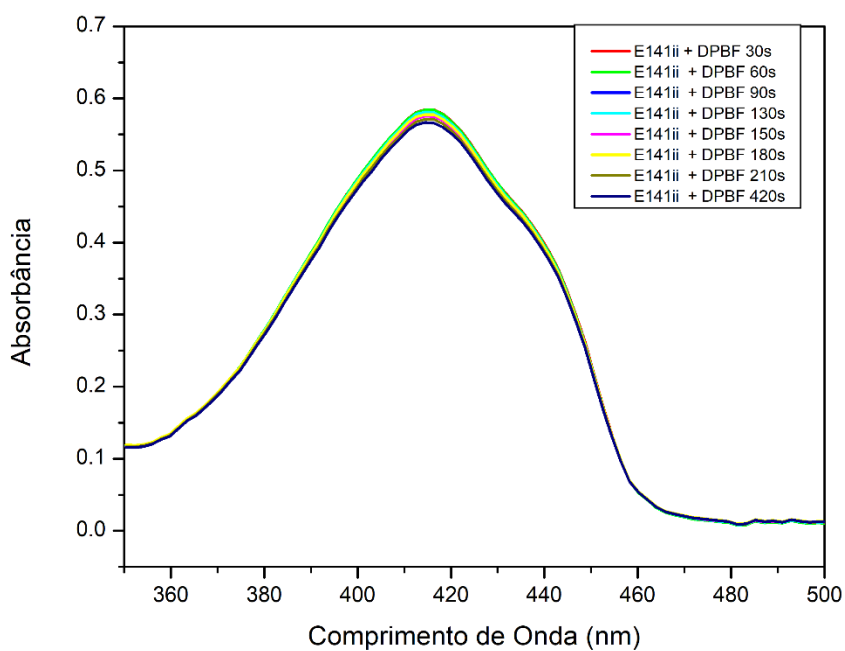
Figura 37 - Fluorescência da E-141ii em 610 nm em função do tempo.



Fonte: O autor

A Figura 38 mostra que não houve alteração da banda de absorção, o que demonstra que não houve degradação do DPBF em função do tempo de irradiação e que, portanto, indica que a E-141ii não produz $^1\text{O}_2$.

Figura 38 - Absorbância do E-141ii e DPBF em função do tempo.



Fonte: O autor

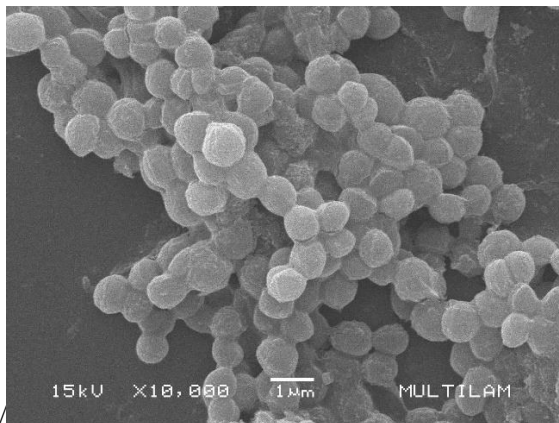
5.4 MEV

5.4.1 Avaliação morfológica de *S. aureus* submetidas a IFD pelo Giemsa

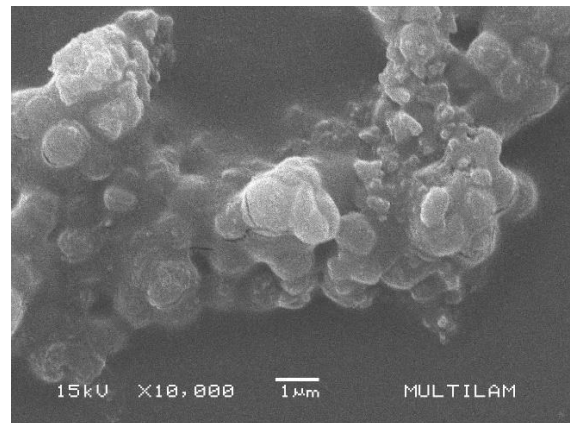
Os resultados de MEV demonstraram que a *S. aureus* apresenta a forma esféricas com aproximadamente 1 μm de diâmetro, agrupadas de maneira irregular. Adicionalmente, a partir das micrografias foi possível observar a integridade das bactérias *S. aureus* do grupo não irradiado. Diferentemente, o processo de IFD onde promoveu danos, parciais ou totais, na parede celular das bactérias quando submetidas a uma dose de energia de 30 J/cm^2 . Esses danos podem lisar as bactérias e, conseqüentemente, inativar o crescimento bacteriano.

Figura 39 – Imagem *S.aureus* utilizando FS Giemsa

A) Controle



B) Irradiada



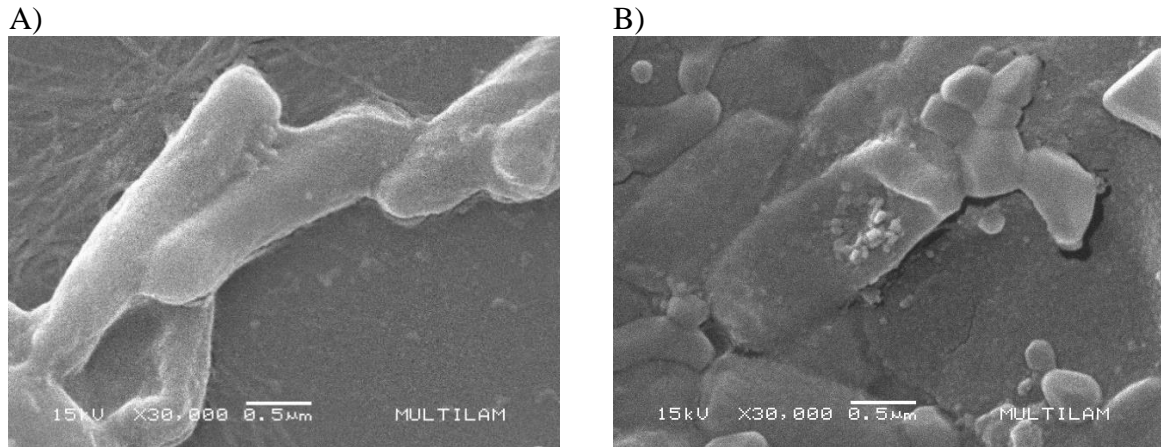
Fonte: O autor.

Nota: Lado A *S. aureus* grupo não irradiado apresentando a integridade das bactérias e lado B grupo irradiado que foi submetido a uma dose de energia de 30 J/cm^2 onde as bactérias estão parcialmente ou totalmente danificadas.

5.4.2 Avaliação morfológica de *E.coli* submetidas a IFD pelo Giemsa

As análises realizadas pelo MEV mostram a estrutura intacta em forma de bastonetes medindo de 1 a 3 μm de diâmetro do grupo que não foi submetido irradiação e a perda da integridade das bactérias que foram submetidos ao processo de IF.

Figura 40 – Imagem *E.coli* utilizando FS Giemsa

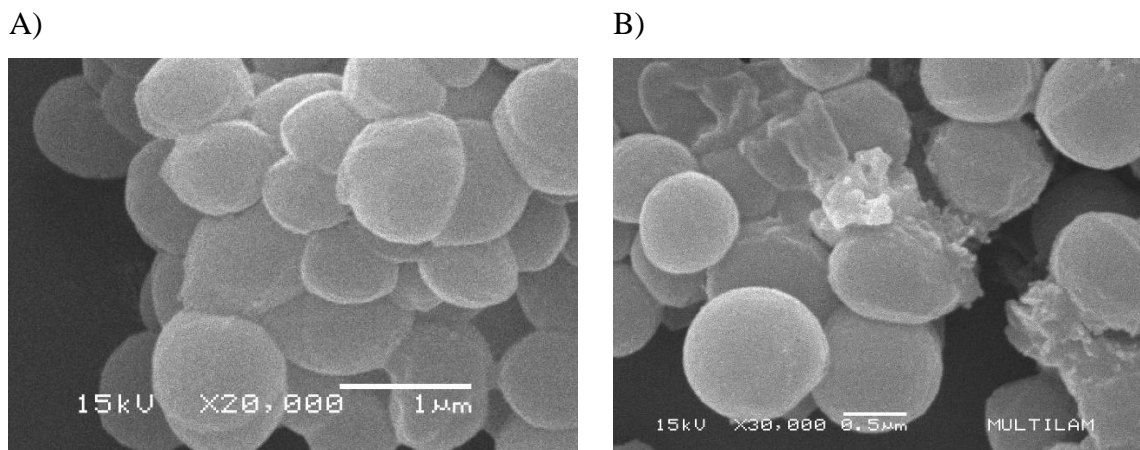


Fonte: O autor.

Nota: Lado A *E.coli* grupo não irradiado apresentando a integridade das bactérias e lado B grupo irradiado que foi submetido a uma dose de energia de 30 J/cm² onde as bactérias estão parcialmente ou totalmente danificadas.

5.4.3 Avaliação morfológica de *S.aureus* submetidas a IFD pela E-141ii

Figura 41– Imagem *S.aureus* utilizando FS E-141ii



Fonte: O autor.

Nota: Lado A *S.aureus* grupo não irradiado apresentando a integridade das bactérias e lado B grupo irradiado que foi submetido a uma dose de energia de 30 J/cm² onde as bactérias estão parcialmente ou totalmente danificadas.

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através deste estudo demonstram que tanto o E-141ii quanto o GIEMSA são capazes de atuar como FSs para *S. aureus*, sensível e resistente a meticilina. Quando a E-141ii é utilizada como FS, contra as cepas de *S. aureus* ATCC e MRSA, houve grande diferença entre as doses letais, que para a ATCC foi de 2,5 μM e para a MRSA foi de 20 μM . Esse resultado colabora com o estudo realizado por Grinholc e colaboradores (2014), que em um estudo contendo mais de 400 amostras clínicas de *S. aureus* MRSA e *S. aureus* MSSA, observou-se que as cepas de *S. aureus* MRSA apresentam maior tolerância a IFD. Porém, não se pôde atribuir ao gene *mec A* o aumento desta tolerância, o que pode ser atribuída a uma defesa ao estresse oxidativo e a bombas de efluxo que dificultam a absorção do FS pela bactéria.

Fournier *et al.* (1989) notou um polissacarídeo capsular na superfície de células MRSA, de tal forma que estes polissacarídeos podem ser responsáveis pela menor penetração do FS nas células MRSA. Ainda segundo Maish, (2015) o que pode estar ocorrendo é um aumento da tolerância em virtude de uma resistência intrínseca da bactéria para sobreviver ao estresse oxidativo gerado pelo meio ambiente.

Há poucos trabalhos que demonstram o potencial fotossensibilizador da E-141ii e nenhum dos trabalhos aplicam a E-141ii em bactérias resistentes a antibióticos, sendo este o primeiro trabalho a testar este FS no processo de fotoinativação da *S. aureus* MRSA. Em sua maioria, os estudos realizados com E141ii tem como objetivo a descontaminação de alimentos como López-Carbalho *et al.*, (2008) onde o mesmo utiliza E-140 e E-141ii no meio de cultura, sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, onde foi demonstrado seu efeito apenas sobre as bactérias Gram-positivas sem resistência a antibióticos *S. aureus* e *L. monocytogenes* reduzindo o crescimento em 5 e 4 logs, respectivamente, ao irradiar com a luz azul.

Em estudo realizado por Krüger *et al.* (2019), utilizando a clorofilina E-140, foi observado que para duas cepas diferentes de *E. coli* onde uma delas, a NR698 apresenta uma deficiência em uma de suas membranas, foi demonstrado que esta cepa com defeito na membrana externa é tão susceptível quanto a bactéria Gram-positiva testada por eles, *Bacillus subtilis*. Demonstrando, portanto, a importância da segunda membrana e sua influência na penetração pela clorofilina para efetividade da IFD. Em trabalho realizado por Caires, *et al.*

(2017) foi demonstrado que não houve efeito da E141ii sobre cepa de *E. coli* (ATCC 25922) mesmo quando utilizando o DMSO a 5% como um agente permeador de membrana.

Apesar de ser mais eficaz contra cepas Gram-positivas, foi demonstrado recentemente que E-141ii pode ser aplicada para fotoinativar *E. coli* combinando alta concentração de FS e iluminação de luz branca (lâmpada halogênica). Neste trabalho também foi testado o uso de LEDs por López-Carbalho *et al.*, (2018), e segundo os autores, a E-141ii quando irradiada por luz LED é pouco efetiva. Assim, eles utilizaram a luz branca através de combinação de cores, diferentemente dos achados neste trabalho, onde foi utilizada apenas a luz vermelha.

Josewin *et al.* (2018) também avaliou a aplicação de E-141ii em associação com iluminação LED azul (405 nm e 460 nm) com doses de 1.210 J/cm² e 5.356 J/cm² e concentração de 100 µM para inativar *L. monocytogenes* e *Salmonella spp.* na casca do melão. Foi observado a eficácia da IFD da E-141ii contra ambas as bactérias, porém, não era estatisticamente diferente da fotoinativação promovida apenas pela luz azul.

Em estudo realizado por Luksiene e colaboradores (2010), a E-140 ao ser aplicada como FS reduziu em 4 logs o crescimento bacteriano da *Bacillus cereus* quando utilizado uma concentração de 7,5 µM sob luz azul (405 nm). Recente trabalho realizado Hasenleitner e Plaetzer (2019), utilizando E-140 contra *S. aureus* (ATCC 25923) e aplicando luz azul e vermelha, observaram uma redução de crescimento de 7 e 4 logs, respectivamente, com concentrações de 1µM para luz azul (433 nm) e 5 µM para luz vermelha (635 nm). Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo usando E-141ii inativando completamente a *S. aureus* (MSSA) em concentrações acima de 2,5 µM iluminando com a luz vermelha.

Segundo Uchoa *et al.* (2015), a E-141ii não funciona como um FS, pois o Cu²⁺ presente no centro porfirínico da molécula faz com que não ocorra a formação de longos estados excitados, e, portanto, não induzirá há formação de ¹O₂. A E-141ii não apresenta fluorescência, a substância também não apresenta estados tripletos, sendo assim seu mecanismo de relaxamento do primeiro estado excitado é por conversão interna (SCIUTIA, *et al.*, 2018). Todavia, a partir do presente foi demonstrado que a molécula é capaz de produzir outras EROs, não determinando, entretanto, quais, e confirma achado também demonstrado por Uchoa *et al.* (2015) e SCIUTIA, *et al.* (2018) que a molécula não produz ¹O₂, e, portanto, o mecanismo de geração de EROs é por transferência de elétrons (reação do tipo I) diretamente do estado singleto excitado do FS.

O coeficiente de partição nos diz se a molécula possui mais afinidade pela fase orgânica ou aquosa, e, portanto, indicando se haverá uma afinidade maior por membranas, ou sangue e outros constituintes, sendo a chave para a atividade fotodinâmica Engelmann *et al.*,

(2007). Ainda com relação a E-141ii podemos dizer após realizar teste de coeficiente de partição, que a molécula demonstra ter mais afinidade pela fase orgânica e, portanto, mais afinidade por membranas gerando $\log P_{o/w} = 1,14$, o estudo morfológico da *S. aureus* demonstrou a manutenção da integridade no escuro e a destruição daquelas que foram submetidas a PDI.

A fenotiazina GIEMSA foi descrito pela primeira vez como possível FS em 2017 por Caires *et al.*, (2017) fotoinativando *S. aureus* ATCC e *E. coli* ATCC. Posteriormente a este trabalho foi demonstrado sua eficiência para eliminar larvas de *aedes aegypti* Lima *et al.*, (2018). No presente estudo, o GIEMSA foi utilizado como FS com o objetivo de avaliar o potencial desta substância para inativar cepas resistentes a antibióticos, onde ambas as cepas ATCC e MRSA *S. aureus*, obtiveram uma dose letal utilizando uma concentração de 10 μM . Todavia, houve grande diferença entre as doses subletais, onde foi observado que para a cepa ATCC houve uma redução de 85% de UFC e para a MRSA houve uma redução de 38% de UFC.

Huang, *et al.*, (2010) obteve resultados similares em configuração parecida utilizando como FS o AM, e eliminando *S. aureus* (cepa 8325-4), onde utilizou uma dose de energia de 10 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ com irradiação de luz vermelha em 660 nm, sem qualquer lavagem ou centrifugação antes da iluminação, e obteve uma mortalidade superior a 6 logs.

Com relação a bactérias Gram-negativas, há uma dificuldade maior de se as eliminar através do PDI, neste caso um agente de permeabilização é necessário devido à sua dupla membrana (SPERANDIO, *et al.* 2013). Assim sendo, uma configuração experimental diferente foi necessária para se atingir a inativação de cepa de *E. coli* ATCC e *E. coli mcr-1* positiva. Para tal, foi utilizado como agente permeador da membrana DMSO, 5% (v/v), e um tempo maior de incubação do que o utilizado para *S. aureus* utilizando como FS o GIEMSA neste estudo.

Assim como descrito por Tang e colaboradores (2007) utilizando uma fenotiazina, o azul de toluidina (AT), é necessária uma maior concentração de FS para se inativar *E. coli* em relação a *S. aureus*, sendo utilizado por eles uma concentração cinco vezes mais elevada para se inativar *E. coli*, utilizando, portanto, 400 μM a 30 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ de luz vermelha (600 nm). Neste trabalho, quando comparamos *S. aureus* e *E. coli*, para ambas as cepas sensíveis (ATCC) a antibióticos observamos que foi necessário dobrar a concentração com a mesma dose de energia, onde encontramos uma dose letal de 10 μM a 30 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$, luz vermelha (625 nm) para *S. aureus*, e de 20 μM a 30 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$, luz vermelha (625 nm) para *E. coli*.

Com relação as cepas de *E. coli* ATCC e *E. coli mcr-1* positiva observamos uma diferença significativa com relação a dose letal, que foi de 20 μM a 30 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$, luz vermelha (625 nm) para a amostra ATCC e de 10 μM a 45 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ para a cepa *mcr-1*, luz vermelha (625 nm), apesar de ser notável a diferença de 40 μM e 50 μM onde houve uma redução de 99% de UFC/mL, não houve dose letal com 30 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$, e por isso foi necessário o aumento a dose de energia luminosa aplicada.

Em estudo realizado por Kashef, *et al.*, (2012) em cepas de *E. coli* e *S. aureus* susceptíveis e resistentes, utilizando duas fenotiazinas o AM e o AT como FS, foi observado que em comparação com o AM, o AT demonstrou melhores resultados para cepas sensíveis do que nas resistentes. O estudo utilizou as seguintes configurações experimentais, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ com dose de energia de 46.8 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ foi capaz de inibir o crescimento de *E.coli* MDR em 0,7 logs e para *E. coli* ATCC 1,7 logs para *S.aureus* ATCC e MRSA na mesma concentração e dose de energia obteve-se uma diminuição de 3,1 logs para MRSA e para ATCC foi de 4,2 logs para o FS AT. Para o FS AM foi necessária uma dose de energia de 163.8 $\text{J}\cdot\text{cm}^2$ na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ reduzindo 2.2 logs para *S.aureus* MRSA e 3logs para ATCC e 0.2 logs para *E.coli* MDR e 0.3 para ATCC. O que demonstra uma maior tolerância ao PDI nas mesmas concentrações e dose de energia das cepas resistentes a antibióticos.

Em estudo realizado por Grinholc e colaboradores (2008) em cepas *S. aureus* (MRSA) e 40 cepas de *S. aureus* sensíveis à metilicina (MSSA), isoladas de pacientes hospitalizados, foi observada uma correlação entre a cepa resistente e ao aumento da tolerância a IFD, mas não foi possível determinar nenhum mecanismo de uma resposta dependente da cepa à fotoinativação, nem mesmo correlacionar a suscetibilidade aos antibióticos, com as proteínas extracelulares e intracelulares.

Com relação ao coeficiente de partição os experimentos demonstraram que o GIEMSA possui grande afinidade por membranas demonstrado através de $\text{Log } P_{O/W} = 0,77$ o que é um fator importante para um bom FS. O estudo morfológico da *S. aureus* e *E. coli* demonstrou a integridade das cepas no escuro e a destruição das membranas celulares das cepas que foram submetidas a IFD. E por fim, com relação aos mecanismos de fotoinativação, podemos dizer que o GIEMSA gera tanto EROS (mecanismo tipo I) quanto $^1\text{O}_2$ (mecanismo tipo II), demonstrando seu grande potencial como FS.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que tanto a GIEMSA quanto E-141ii possuem potencial para serem FS em IFD, tendo efeito mesmo em baixas concentrações. Ambos FSs possuem atividade fotoantimicrobiana sobre *S. aureus*. A E-141ii também possui boa afinidade por membranas e alta solubilidade em água, e o fato deste composto já ser utilizado como corante de alimentos o faz ser um ótimo candidato como FS. E no caso do GIEMSA este FS demonstrou efeito de fotoinativação, para *S. aureus* e *E. coli*, eliminando tanto as cepas sensíveis e quanto aquelas resistentes a antibióticos. Nosso estudo de coeficiente de partição, demonstrou que os FS possuem afinidade por membranas o que é essencial para um bom fotossensibilizador. A partir dos experimentos de determinação de produção de EROs pudemos observar que ambos os FS geram EROs (mecanismo tipo I) utilizando a luz vermelha 630 nm que possui boa penetração nos tecidos, e o GIEMSA gera tanto EROS quanto $^1\text{O}_2$ (mecanismo tipo II). Assim podemos concluir que os FSs estudados possuem grande potencial para atuar contra bactérias Gram positivas e negativas sensíveis e resistentes a antibióticos, além de estar dentro da janela terapêutica fotodinâmica ideal, na região do vermelho do espectro eletromagnético, apresentando um grande potencial para futuras aplicações para o combate de infecções bacterianas.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSE, H. AND HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochem J.** v. 473, n.4, p. 347–364, fev., 2016.

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

ALLISON, R. R.; SIBATA, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 2, p. 61-75, April, 2010.

ALONSO, L. **Análise comparativa da eficiência fotodinâmica de fotossensibilizadores em sua forma base livre e formando complexados com zinco**. 2014. 68f. Dissertação (mestrado em Física). Instituto de Física, UFG, Goiania, 2014.

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

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

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

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

BOUCHER, H. W.; TALBOT, G. H.; BRADLEY, J. S.; EDWARDS JR, J. E.; GILBERT, D.; RICE, L. B.; SCHELD, M.; SPELLBERG, B.; BARTLETT, JOHN. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America, **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 1–12, jan. 2009.

CARLONI, P.; DAMIANI, E.; GRECI, L.; STIPA, P.; TANFANI, F.; TARTAGLINI, E.; WOZNIAK, M. On the use of 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF). Reactions with carbon and oxygen centered radicals in model and natural systems. **Research on Chemical Intermediates**, v. 19, n. 5, p. 395–405, jan. 1993.

CAIRES, C. S. A. **Avaliação da Inativação Fotodinâmica em *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* Utilizando os Fotossensibilizadores Eosina Azul de Metileno e Metaloclorofilina**. 2017. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Faculdade de Medicina. UFMS, Campo Grande, 2017.

CAIRES, C. S. A.; LEAL, C. R. B.; RAMOS, C. A. N.; BOGO, D.; LIMA, A. R.; ARRUDA, E. J.; OLIVEIRA, S. L.; CAIRES, A. R. L.; NASCIMENTO, V. A. Photoinactivation effect of eosin methylene blue and chlorophyllin sodium-copper against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n.5, p. 1081-1088. july. 2017.

CAIRES, C. S. A.; LEAL, C. R. B.; RODRIGUES, A. C. S.; LIMA, A. R.; SILVA, C. M. ; RAMOS, C. A. N.; CHANG, M. R.; ARRUDA, E. J.; OLIVEIRA, S. L.; NASCIMENTO, V. A.; CAIRES, A. R. L. Photoinactivation of *mcr-1* positive *Escherichia coli*. **Laser Physics Letters**. V. 15, p. , 2018.

CALVETE, M. J. F.; GOMES, A. T. P. C.; MOURA, N. M. M. Clorinas em Terapia Fotodinâmica – Síntese e aplicações. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 2, 2009.

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

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

ENGELMANN, F. M.; ROCHA, S. V.; TOMA, H. E.; ARAKI, K.; BAPTISTA, M. S. Determination of n-octanol/water partition and membrane binding of cationic porphyrins. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 329, n. 1-2, p. 12-18, 2007.

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

FERREIRA, J.; MENEZES, P. F.C. **Terapia fotodinâmica para tumores**. In: *Novas Técnicas ópticas para as áreas da saúde*. 1. ed. São Paulo: Editora livraria da Física, 2008. Cap. 5, p.97-122.

FORDE, B. M.; ZOWAWI, H. M.; HARRIS, P. N. A.; ROBERTS, L.; IBRAHIM, E.; SHAIKH, N.; DESHMUKH, A.; AHMED, M. A. S.; MASLAMANI, M. A.; COTTRELL, K.; TREMBIZKI, E.; SUNDAC, L.; YU, H. H.; LI, J.; SCHEMBRI, M. A.; WHILEY, D. M.; PATERSON, D. L.; BEATSONA, S. A. Discovery of *mcr-1*-Mediated Colistin Resistance in a Highly Virulent *Escherichia coli* Lineage. **mSphere**, v. 3, n. 5, sep-oct, 2018.

FOURNIER, J.M.; BOUTONNIER, A.; BOUVET, A. Staphylococcus aureus strains which are not identified by rapid agglutination methods are of capsular serotype 5. **J. Clin. Microbiol.** v. 27, n.6, p. 1372–1374, 1989.

FLEISCHER, B. Editorial: 100 years ago: Giemsa's solution for staining of plasmodia. **Tropical Medicine and International Health**, v. 9, n. 7, p. 755–756, july 2004.

FRIEDEN, T. **Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States**. Disponível em: www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf. FRESHNEY, I. R. Culture of animal cells. A manual of Basic Technique. 5 ed. New York: Wiley-Liss, 2005.

GELATTI, L. C.; BONAMIGO, R. R.; BECKER, A. P.; AZEVEDO, P. A. Staphylococcus aureus resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 501-6, 2009.

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

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

GRINHOLC, M.; SZRAMKA, B.; KURLEND, J.; GRACZYK, A.; BIELAWSKI, K. P. Bactericidal effect of photodynamic inactivation against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is strain-dependent. **J Photochem Photobiol B**. v. 90, n. 1, p. 57-63, jan. 2008.

GRINHOLC, M.; RAPACKA-ZDONCZYK, A.; RYBAK, B.; SZABADOS, F.; BIELAWSKI, K. P. Multiresistant strains are as susceptible to photodynamic inactivation as their naïve counterparts: protoporphyrin IX-mediated photoinactivation reveals differences between methicillin-resistant and methicillinsensitive *Staphylococcus aureus* strains. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 32, n. 3, p. 121–129, mar. 2014.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GURR, E. Rate of Eosin in Romanowsky Staining of Malaria Nucleos. **Nature**, v. 202, n. 4936, p.1022-1023, june, 1964.

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

HASENLEITNER, M.; PLAETZER, K. In the Right Light: Photodynamic Inactivation of Microorganisms Using a LED-Based Illumination Device Tailored for the Antimicrobial Application. **Antibiotics**, v.9, n.1, Dec. 30, 2019.

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

HOROBIN, R. W. How Romanowsky stains work and why they remain valuable — including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 86, n.1, p. 36–51, Feb. 2011.

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

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

KALÁB, M.; YANG, A.; CHABOT, D. Conventional Scanning Electron Microscopy of Bacteria. **Infocus magazine**, United Kingdom, v. n.10, p.43-61, June, 2008.

KASHEF, N.; RAVAEI, S. A. G.; DJAVID, G. E. Phototoxicity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Escherichia coli*. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** v. 9, n. 1, p. 11-15, mar. 2012.

KEMPF, I.; JOUY, E.; CHAUVIN, C. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 6, p. 598-606, dec. 2016.

KÖCK, R.; BECKER, K.; COOKSON, B.; GEMERT-PIJNEN, J. E.; HARBARTH, S.; KLUYTMANS, J.; MIELKE, M.; PETERS, G.; SKOV, R. L.; STRUELENS, M. J.; TACCONELLI, E.; WITTE, W.; FRIEDRICH, A. W. Systematic literature analysis and review of targeted preventive measures to limit healthcare-associated infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Euro Surveillance.** v.19, n. 29, p. 23-49, july, 2014.

KRÜGER, M.; RICHTER, P.; STRAUCH, S. M.; NASIR, A.; BURKOVSKI, A.; ANTUNES, C. A.; MEIßGEIER, T.; SCHLÜCKER, E.; SCHWAB, S.; LEBERT, M. What an *Escherichia coli* Mutant Can Teach Us About the Antibacterial Effect of Chlorophyllin. **Microorganisms**, v.7, n. 2, p. 59, feb. 2019.

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

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12, p.122-129, nov. 2004.

LIMA, A. R.; SILVA, C. M.; CAIRES, C. S. A.; PRADO, E. D.; ROCHA, L. R. P.; CABRINI, I.; ARRUDA, E. J. OLIVEIRA, S. L.; CAIRES, A. R. L. Evaluation of Eosin-Methylene Blue as a Photosensitizer for Larval Control of *Aedes aegypti* by a Photodynamic Process. **Insects**, v. 9, n. 3, p. 1-8, Aug. 2018.

LIU Y.; WANG Y.; WALSH, T. R.; YI, L.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, D.; ZHOU, H.; LIANG, Z.; LIU, J.; SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161–68, 2016.

LÓPEZ-CARBALLO, G.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; GAVARA, R.; AND OCIO, M. J. Photoactivated chlorophyllin-based gelatin films and coatings to prevent microbial contamination of food products. **International Journal of Food Microbiology** v.126, n. 1-2, p. 65-70, 2008.

LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A. T.; HERDEIRO, M. T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública.** v. 34, n.1, p. 77–84, 2016.

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

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

MAISCH, T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.14, n.8, p. 1518–1526, 2015, 2015.

MEJÍA, C., ZURITA, J., GUZMÁN-BLANCO, M. Epidemiology and surveillance of methicillin resistant staphylococcus aureus in Latin America. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 14, p.79-86, 2010.

MENEZES, P. F. C. Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem fotodegradado e fotoprodutos formados pela irradiação com laser. 2007. 182f. Tese (Doutorado em Química). instituto de Química. USP, São Carlos, 2007.

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

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

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

PATERSON, D. L.; HARRIS, P. N. Colistin resistance: a major breach in our last line of defence. **Lancet infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 132-133, feb. 2016.

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

PERUSSI, J. R., IMASATO, H. **Inativação fotodinâmica de microrganismos**. In: BAGNATO, V. S. Novas técnicas ópticas para área da saúde. São Paulo: Editora Livraria da Física, cap.8, 2008.

PEDIGO, L. A.; GIBBS, A. J.; SCOTT, R. J.; STREET, C. N. Absence of bacterial resistance following repeat exposure to photodynamic therapy. **Proceedings SPIE**, Photodynamic Therapy: Back to the Future, 73803H, v. 7380, July, 2009.

PIVETTA, R. C.; AURAS, B. L.; SOUZA, B.; NEVES, A.; NUNES, F. S.; COCCA, L. H. Z.; BONI, L. IGLESIAS, B. A. Synthesis, photophysical properties and spectroelectrochemical characterization of 10-(4-methyl-bipyridyl)-5,15-(pentafluorophenyl) corrole. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.332 p. 306-315, 2017.

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

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

RIBEIRO, A. V. F. N.; SILVA, A. R.; NOVAES, G. P.; BELISÁRIO, M.; JORGE, R. A.; RIBEIRO, J.N. Substâncias ativadas pela luz: potentes armas na batalha contra o câncer, **InterScience Place** v. 1, n. 2, jan. 2008, disponível em <<http://www.researchgate.net/publication/253645799>>. Acesso em abril 2019.

SABNIS, R. W. **Handbook of biological dyes and stains synthesis and industrial applications**, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken-New Jersey, 2010.

SANTOS, A. L.; OLIVEIRA, D. S.; FREITAS, C. C.; LEAL, B. A. F.; AFONSO, I. F.; RANGEL, C. R.; CASTRO, H. C. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, dez. 2007.

SCIUTIA, L.F.; COCCA, L.H.Z.; CAIRES, A.R.L.; GONÇALVES, P.J.; BONI, L.DE. Picosecond dynamic of aqueous sodium-copper chlorophyllin solution: An excited state absorption study. **Chemical Physics Letters**, v. 706, p. 652-657, Aug. 2018.

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

SNELL, S. B.; GILL, A. L.; HAIDARIS, C. G.; FOSTER, T. H.; BARAN, T. M., GILL S. R. *Staphylococcus aureus* Tolerance and Genomic Response to Photodynamic Inactivation. **mSphere**. v. 6, n. 1, Jan. 2021.

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

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

TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R. Phenothiazinium Antimicrobial Photosensitizers Are Substrates of Bacterial Multidrug Resistance Pumps. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 196–203, jan. 2006.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5^a ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TUMOLO, T.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Copper chlorophyllin: A food colorant with bioactive properties? **Food Research International** v. 46, n. 2, p. 451-459, Ottawa, apr. 2012.

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

ULIANA, M. P.; SILVA, A. P.; INADA, N. M.; SERRA, O. A.; NERI, C. R.; SILVA, R. C.; OLIVEIRA, K. T.; Fotossensibilizadores. In: Controle Microbiológico com Ação Fotodinâmica. Editora Compacta, São Carlos-SP, 2017. p.45-64.

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

VIERA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A.; ROCA, M. Green Natural Colorants. **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 154. Jan. 2019.

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

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

World Health Organization (WHO) Antimicrobial resistance, 31 Jul 2020. Disponível em:<<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. >. Acesso em: 18 set. 2020.

World Health Organization. Global action plan on antimicrobial resistance. World Health Organization, 2015. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/193736>>. Acesso em: 18 set. 2020.

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

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

Yazdani, M. Concerns in the application of fluorescent probes DCDHF-DA, DHR 123 and DHE to measure reactive oxygen species in vitro. **Toxicol In Vitro**, v.25, n.30, p.578-8, dec. 2015.

YOSHIME, L.T. **Identificação e propriedades físico-químicas da clorofilina cúprica de sódio e da clorina cúprica e6**. 2011. 144f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. USP, São Paulo, 2011.

ZHANG, J.; JIANG, C.; LONGO, J. P. F.; AZEVEDO, R. B.; ZHANG, H.; MUEHLMANN, L. A. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 8, n. 2, p. 137–146, mar.2018.

ZURFLUH, K.; STEPHAN, R.; WIDMER, A.; POIREL, L.; NORDMANN, P.; NÜESCH, H. J.; HÄCHLER, H.; NÜESCH-INDERBINEN, M. Screening for fecal carriage of MCR-producing Enterobacteriaceae in healthy humans and primary care patients. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 6, n. 28, p.1-4, mar. 2017.