

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

CRISTIANO BRAGA DE OLIVEIRA

INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DO MICRORGANISMO *Staphylococcus aureus*
PRESENTE EM LEITE CRU E PASTEURIZADO

Maceió- AL

2016

CRISTIANO BRAGA DE OLIVEIRA

**INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DO MICRORGANISMO *Staphylococcus aureus*
PRESENTE EM LEITE CRU E PASTEURIZADO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Física, da Universidade Federal de Alagoas como requisito necessário para a obtenção do título de MESTRE em Física pelo programa de Pós- Graduação em Física.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Tereza de Araujo

Maceió- AL

2016

Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

O48i Oliveira, Cristiano Braga de.
Inativação fotodinâmica do microrganismo *Staphylococcus aureus* presente em leite cru e pasteurizado / Cristiano Braga de Oliveira. – 2016.
112 f. : il., tabs e gráfs.

Orientadora: Maria Tereza de Araujo.
Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Federal de Alagoas.
Instituto de Física. Programa de Pós-Graduação em Física. Maceió, 2016.

Bibliografia: f. 98-106.
Anexos: f. 107-112.

1. Inativação fotodinâmica. 2. Terapia fotodinâmica. 3. Sal de Curcumina.
4. Dose de luz. 5. *Staphylococcus aureus*. 6. Terapia fotodinâmica microbiana.
I. Título

CDU: 53.08



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Física
Programa de Pós Graduação em Física

BR 104 km 14. Campus A.C. Simões
Cidade Universitária
Tabuleiro dos Martins
57072-970 Maceió - AL. Brasil
FONE : (82) 3214-1423/FAX 3214-1645

PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

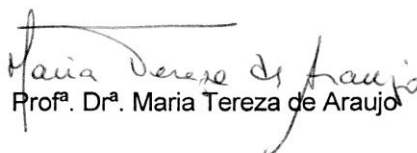
“Inativação Fotodinâmica do Microrganismo Staphylococcus aureus presente em leite cru e pasteurizado”.

por

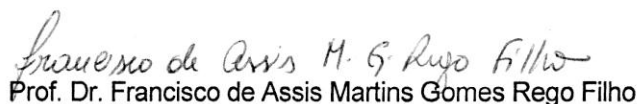
Cristiano Braga de Oliveira

A Banca Examinadora composta pelos professores Maria Tereza de Araujo (orientadora), do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, Ângela Froehlich, do Instituto Federal de Alagoas – Campus Satuba, e Francisco de Assis Martins Gomes Rego Filho, do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, consideram o candidato **aprovado com grau “A”**.

Maceió, 29 de fevereiro de 2016


Prof.^a. Dr.^a. Maria Tereza de Araujo


Prof.^a. Dr.^a. Ângela Froehlich


Prof. Dr. Francisco de Assis Martins Gomes Rego Filho

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem ele eu não teria forças para essa longa jornada, a meu pai Paulo Oliveira, minha mãe Esmeralda Braga, e as minhas irmãs Flavia Braga e Fernanda Braga, com muito amor e gratidão.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus, que se mostrou criador, que foi criativo. Seu fôlego de vida em mim foi sustento e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

A minha Família que confiou e aceitou minhas escolhas e que estiveram ao meu lado em todas as horas desta caminhada, sabendo pacientemente entender e acalmar os momentos bons e momentos difíceis. Tenho todo carinho e admiração por vocês, muito obrigada, eu amo todos vocês.

Ao Programa de Pós-Graduação em Física, PPGF, pela oportunidade da realização deste trabalho em minha área de pesquisa.

Agradeço a minha professora orientadora Maria Tereza de Araujo que teve paciência e me ajudou bastante a concluir este trabalho, com quem partilhei o que era o broto daquilo que veio a ser esse trabalho. Nossas conversas durante e para além dos grupos de estudos foram fundamentais.

Agradeço a professora Maria Cristina Delgado da Silva pela colaboração e disponibilização de seu laboratório, pois sem este não seria possível à realização deste trabalho. Também agradeço ao professor Ticiano Gomes e a professora Giselda Lira por cederem seus laboratórios para realizações de processos experimentais.

Aos professores do programa de Pós-Graduação pela dedicação e competência em suas atuações e que durante muito tempo me ensinaram e mostraram o quanto estudar é bom.

A todos os funcionários da Universidade Federal de Alagoas que sempre tão compreensivos e prestativos, não medindo esforços para atender às solicitações requeridas.

A banca examinadora por ter aceitado participar e contribuir com o diálogo enriquecedor do trabalho.

A todos os alunos do LCQA por todo o apoio na realização da pesquisa, em especial a aluna Erika e o técnico Cantideo pela colaboração mais ativa na realização deste trabalho.

A todos os colegas e amigos de caminhada, pelas dúvidas e angústias compartilhadas e pela amizade construída, em especial à Waleria Ribeiro, grande amiga, foi mais do que colega, foi apoio, carinho, ombro amigo, compreensão, partilha, alegria, companheirismo e pelas angustias compartilhadas, pelos conselhos e pela alegria da companhia.

Ao Laboratório de Espectroscopia do GFFC, equipe de Professores e aos alunos que compartilharam dos momentos de construção da pesquisa, pela generosidade, disponibilidade, paciência e carinho demonstrado.

A todos que com muito esforço e dedicação que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

Ao apoio financeiro através do projeto Pronex – NEXO.

A CAPES pela provisão da bolsa de mestrado.

RESUMO

Nos últimos anos a Terapia Fotodinâmica vem sendo aplicada em diversas áreas. Uma destas é a desinfecção de alimentos através da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFA) ou Inativação Fotodinâmica (IFD). A Inativação Fotodinâmica mostra-se como forte alternativa no controle de agentes patogênicos resistentes, uma vez que os produtos citotóxicos gerados agem de forma indiscriminada na destruição de estruturas celulares. O mecanismo de ação da IFD ocorre quando um determinado fotossensibilizador (FS) é excitado por uma fonte de luz em comprimento de onda ressonante com a sua banda de absorção, promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio que apresentam ação citotóxica contra microrganismos. Neste estudo, a IFD é apresentada como mecanismo de inativação do microrganismo *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) presente no leite, utilizando como FS um sal de Curcumina (PDT Pharma – Cravinhos – SP), que por ser um FS natural, vem ganhando espaço nas pesquisas científicas. Utilizamos a IFD para a descontaminação de leite em duas formas: cru e pasteurizado. Dividimos nosso trabalho em duas investigações: uma microbiológica usando solução aquosa de leite e outra variando a concentração de leite de 10% até 100%. Em ambas as etapas avaliamos a eficácia da técnica monitorando a população do microrganismo *S. aureus*, *in loco*, como função das concentrações de 750, 1500 e 3000 mg/L do FS. Nosso protocolo constava de 4 (quatro) grupos: G1 (controle: leite e *S. aureus*), G2 (leite, *S. aureus* e Curcumina), G3 (leite, *S. aureus* e Luz) e G4 (leite, *S. aureus*, Curcumina e Luz (IFD)). Os parâmetros de iluminação foram as potências de 30, 60 e 110 mW oriundas de um sistema LED em 450 nm (BioPDI-São Carlos-SP) e os tempos de exposição de 5 e 30 minutos, o que nos geraram as doses de luz de 9, 18, 33, 54, 108 e 198 J/cm². Os resultados microbiológicos obtidos mostraram que o FS na concentração de 750 mg/L foi bastante efetivo com as doses de luz de 33, 54, 108 e 198 J/cm², realizando inativação total das colônias de *S. aureus* comparado ao grupo controle, tanto para o leite cru quanto para o leite pasteurizado. Para entender os resultados com leite nas concentrações de 10% a 100%, realizamos medidas de profundidade de penetração da luz nessas amostras e traçamos curvas de isointensidades, o que nos permitiu visualizar que o leite se comporta como um meio altamente espalhador, diminuindo a penetração da luz à medida que aumentamos sua concentração. Os resultados obtidos com o teor de proteína antes e depois da IFD mostrou que a variação proteica foi mínima.

Palavras-chave: Inativação Fotodinâmica. Terapia Fotodinâmica. Sal de Curcumina. Dose de Luz. *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Over the past few years Photodynamic Therapy have been applied on multiple areas. One of these is the food disinfection through the Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) or Photodynamic Inactivation (PDI). Photodynamic Inactivation shows up as a strong alternative in controlling resistant pathogens agents, once the generated cytotoxic products act in a indiscriminate way to destroy celular structures. The mechanism of action of PDI occurs when a specific photosensitizer (PS) is excited by a light source in resonant wavelength with its absorption band, promoting the formation of reactive oxigen species that exhibit cytotoxic action against microorganisms. In this study, the PDI is presented as a mechanism of inactivation of the microorganism *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) present in the milk, using as PS a Curcumin salt (PDT Pharma – Cravinhos – SP), which is a natural PS and has been gaining ground in scientific researches. We used PDI to milk decontamination in two ways: raw and pasteurized. We divided our work in two investigations: a microbiological one, using aqueous solution of milk, and another one, varying the concentration of milk from 10% to 100%. In both steps we evaluated the efficacy of the technical monitoring the population of microorganism *S. aureus*, in loco, as a function of the concentrations of 750, 1500 and 3000 mg/L of PS. Our protocol consisted of 4 (four) groups: G1 (control: milk and *S. aureus*), G2 (milk, *S. aureus* and Curcumin), G3 (milk, *S. aureus* and light) and G4 (milk, *S. aureus*, Curcumin and light (PDI)). The light parameters were the powers of 30, 60 and 110 mW from a LED system in 450 nm (BioPSY-São Carlos-SP) and the exposure times from 5 to 30 minutes, which generated to us doses of 9, 18, 33, 54, 108 and 198 J/cm². The microbiological results obtained showed that the PS in concentration of 750 mg/L was extremely effective with doses of light of 33, 54, 108 and 198 J/cm², performing total inactivation of the *S. aureus* colonies when compared with control group, both for raw milk and to pasteurized milk. To understand the results with milk in concentrations from 10% to 100%, we performed measures of penetration depth of light in these samples and we draw isointensity curves, which allowed us to see that the milk behaves as a highly scattering medium, decreasing the light penetration as we increase its concentration. The results obtained with the protein content before and after PDI exhibited that proteic variation were minimal.

Key-words: Photodynamic Inactivation. Photodynamic Therapy. Curcumin Salt. Light Doses. *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Destaque para a região do visível no espectro eletromagnético	19
Figura 2 - Geometria da reflexão, refração, absorção e espalhamento de um feixe de luz incidindo em um meio	20
Figura 3 - Diagrama Perrin-Jablonski para ilustração dos processos espectrais de absorção, fluorescência e fosforescência	25
Figura 4 - Espalhamento Mie e Rayleigh nas diferentes estruturas celulares	26
Figura 5 - Geometria simples do espalhamento Rayleigh	26
Figura 6 - Princípio da similaridade, onde os fótons que tomam caminhos diferentes chegam ao mesmo ponto final	33
Figura 7 - Relação entre a taxa de fluência e o tempo de exposição para diferentes modos de interação.....	35
Figura 8 - Ilustração dos principais alvos celulares afetados pela TFD	38
Figura 9 - O progresso tecnológico de três revoluções do século 20 na fotônica	39
Figura 10 - O diagrama de Jablonski mostra os mecanismos de geração de EROs pela combinação de luz, fotossensibilizador (FS) e oxigênio no estado fundamental ($^3\text{O}_2$)	42
Figura 11 - O diagrama de Jablonski mostra os níveis de energia envolvidos na TFD e transições eletrônicas associadas a agentes fotodinâmicos	44
Figura 12 - <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina.....	50
Figura 13 - Diagramas ilustrando diferenças na estrutura da membrana entre as bactérias Gram-positivas (a) e Gram-negativas (b)	52
Figura 14 - <i>Laser</i> verde usado para aplicações na fotônica.....	53
Figura 15 - Comparação entre espectros de emissão de um <i>laser</i> e de um LED	55
Figura 16 - Estrutura de dois fotossensibilizadores com aplicação em TFD	56
Figura 17 - A <i>Cúrcuma</i> (a) planta e (b) rizoma	58
Figura 18 - Estrutura química dos compostos biologicamente ativos a partir do açafrão: (a) Curcumina, (b) Demetoxicurcumina e (c) Bisdemetoxicurcumina.....	59
Figura 19 - Espectros de absorção e emissão do sal de curcumina. No detalhe foto mostrando excitação em 405 nm e fluorescência em 530 nm	60

Figura 20 - (a) <i>Staphylococcus aureus</i> visualizado no microscópio eletrônico e (b) colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> no meio Ágar Baird Parker	61
Figura 21: Arranjo experimental para medidas de penetração e espalhamento de luz em <i>Phantoms</i> das soluções aquosas de leite.....	67
Figura 22 - Esquema para obtenção das diluições.....	69
Figura 23 - Método de semeadura com alça Drigalski.....	70
Figura 24 - Sistema de LEDs irradiando em 450 nm: (1) Fonte de corrente alimentadora, (2) Placas com os LEDs e (3) Amostra irradiada.....	72
Figura 25 - Esquema do procedimento de IFD para cada grupo investigado.....	74
Figura 26 - Esquema utilizado para o teste de temperatura com um multímetro digital.....	75
Figura 27 - Variação da IFD em soluções aquosas de leite cru (a) e leite pasteurizado (b) iluminadas em 450 nm.....	79
Figura 28 - (a) Curvas de intensidades de luz nos <i>phantoms</i> para várias diluições do leite e no detalhe a penetração como função das diluições; (b) Curvas de isointensidade para diluições de 10%, 40%, 70% e 100%	80
Figura 29 - Avaliação das diferentes doses de luz na inativação do <i>S. aureus</i> no leite cru, variando as concentrações do FS para os grupos G2 (CURCUMINA) e G4 (IFD). Valores médios de \log_{10} (UFC/mL) e desvio-padrão.....	84
Figura 30 - Investigação da inativação do <i>Staphylococcus aureus</i> no leite cru para as diferentes doses nos grupos G1 (CONTROLE), G2 (CURCUMINA), G3 (LUZ) e G4 (IFD).....	85
Figura 31 - Avaliação das diferentes doses na inativação do <i>Staphylococcus aureus</i> no leite pasteurizado, variando as concentrações do FS para os grupos G2 (CURCUMINA) e G4 (IFD). Valores médios de \log_{10} (UFC/mL) e desvio-padrão.....	89
Figura 32 - Avaliação das diferentes doses na inativação do <i>Staphylococcus aureus</i> no leite pasteurizado, variando os grupos G1 (CONTROLE), G2 (CURCUMINA), G3 (LUZ) e G4 (IFD).	90
Figura 33 - Variações de temperatura sofridas pelo Leite Cru (a) e Leite Pasteurizado (b) no intervalo de 0 a 30 minutos durante a IFD	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cinética de fotossensibilização (S: fotossensibilizador, RH: substrato com ligação-H, CAR: carotenoide).....	36
Tabela 2 - Tempos característicos dos processos associados à absorção e a emissão de fótons.....	47
Tabela 3 - Substâncias constituintes do leite	63
Tabela 4 - Principais vantagens e desvantagens da pasteurização	64
Tabela 5 - Principais microrganismos encontrados em alimentos	64
Tabela 6 - Número de colônias de bactérias por diluição para o leite cru.....	70
Tabela 7 - Número de colônias de bactérias por diluição para o leite pasteurizado.....	70
Tabela 8 - Concentrações do sal de Curcumina utilizadas na inativação de <i>Staphylococcus aureus</i>	71
Tabela 9 - Doses, potências, tempos de exposição de luz nas amostras e área iluminada	72
Tabela 10 - Grupos experimentais segundo a concentração do fotossensibilizador, potência irradiada, tempo de exposição e dose de luz	73
Tabela 11 - Medidas descritivas em Log ₁₀ (UFC/mL) para o grupo G1 (CONTROLE) e G2 (CURCUMINA) em leite cru	81
Tabela 12 - Medidas descritivas em Log ₁₀ (UFC/mL) para o grupo G1 (CONTROLE) e o grupo G4 (IFD) para as potências de 30, 60 e 110 mW com o tempo de 5 minutos.....	82
Tabela 13 - Medidas descritivas em Log ₁₀ (UFC/mL) para o grupo G1 (CONTROLE) e o grupo G4 (IFD) para as potências de 30, 60 e 110 mW com o tempo de 30 minutos.....	83
Tabela 14 - Medidas descritivas em Log ₁₀ (UFC/MI) para o grupo G1 (CONTROLE) e G2 (CURCUMINA) em leite pasteurizado	87
Tabela 15 - Medidas descritivas em Log ₁₀ (UFC/mL) para o grupo G1 (CONTROLE) e o grupo G4 (IFD) para as potências de 30, 60 e 110 mW com o tempo de 5 minutos.....	87
Tabela 16 - Medidas descritivas em Log ₁₀ (UFC/mL) para o grupo G1 (CONTROLE) e o grupo G4 (IFD) para as potências de 30, 60 e 110 mW com o tempo de 30 minutos.....	88
Tabela 17 - Temperatura a cada minuto para cada potência durante a IFD	92
Tabela 18 - Porcentagem de proteína contida no leite cru e no leite pasteurizado antes e depois da IFD	95

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Objetivo Geral	18
1.2	Objetivos Específicos	18
2	INTERAÇÃO DA LUZ COM MEIOS BIOLÓGICOS.....	19
2.1	Índice de Refração.....	21
2.2	Reflexão e Refração.....	21
2.3	Absorção.....	22
2.4	Espalhamento.....	25
2.5	Espalhamento Anisotrópico.....	31
2.6	Meios Túrbidos.....	32
2.7	Mecanismos de Interação	34
2.7.1	Interações Fotoquímicas	35
3	TERAPIA FOTODINÂMICA, INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA, FOTOSSENSIBILIZADOR, MICRORGANISMO E MEIO INVESTIGADO.	38
3.1	Histórico	39
3.2	Mecanismos da Terapia Fotodinâmica (TFD).....	41
3.2.1	Reações tipo I	42
3.2.2	Reações tipo II.....	43
3.2.3	Interações fotoquímicas e fotofísicas na TFD	44
3.2.4	Dosimetria	47
3.3	Terapia Fotodinâmica Atimicrobiana (TFA) ou Inativação Fotodinâmica (IFD).....	48
3.4	Mecanismos de Inativação de Células Microbianas.....	50
3.5	Iluminação Utilizada na IFD	52
3.5.1	Luz coerente	53
3.5.2	Luz incoerente	54
3.6	Fotosensibilizador (FS)	55
3.6.1	Sal de Curcumina.....	57
3.7	<i>Staphylococcus aureus</i>	60
3.8	Leite Cru e Pasteurizado.....	62

4 MATERIAIS E MÉTODOS	66
4.1 Medidas de Penetração e Espalhamento da Radiação em <i>Phantoms</i>	66
4.2 Aplicação da IFD no <i>S. aureus</i> Seguindo a Análise Microbiológica	67
4.2.1 Meios de cultura	67
4.2.2 Microrganismo.....	68
4.2.3 Amostras de leite cru e pasteurizado	68
4.2.4 Teste de diluição.....	68
4.2.5 Fotossensibilizador	71
4.2.6 Iluminação e dosimetria.....	71
4.2.7 Formação dos grupos.....	72
4.2.8 Aplicação da inativação fotodinâmica	74
4.2.9 Teste térmico	75
4.2.10 Determinação do teor de proteína nas amostras de leite	76
4.2.10.1 Cálculo do teor de proteína.....	76
4.2.11 Análise estatística	77
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	78
5.1 Penetração da Luz em 450 nm no Leite Puro e com Diluições.....	78
5.2 Avaliação da IFD no <i>S. aureus</i> Seguindo a Análise Microbiológica.....	81
5.2.1 Leite cru.....	81
5.2.2 Leite pasteurizado.....	87
5.2.3 Teste térmico	91
5.2.4 Teor de proteína.....	95
6. CONCLUSÃO.....	96
REFERÊNCIAS	98
ANEXOS (1 e 2).....	107

1. INTRODUÇÃO

Historicamente a utilização da luz e compostos fotossensíveis pelo ser humano como forma de tratamento tem relatos desde a pré-história [1-3]. No fim de 1900, Oscar Raab mostrou que o efeito observado pela transferência de energia da luz para uma substância química o cloridrato de acridina (um corante), contra *Paramecium caudatum* (protozoário causador da malária) era efetivo em sua inativação quando comparada com seu efeito sem luz. Outras substâncias fotoativas foram utilizadas em inativação de microrganismo a partir desse período como a eosina, hidrocloreto de acridina, Rosa de Bengala (RB), Azul de Toluidina O (TBO), Azul de Metileno (AM) e outros. Relatos mostram o uso da luz e um agente fotossensibilizante para inativar bactérias bem antes da segunda guerra mundial, mas com a grande utilização das penicilinas e outras drogas antibióticas, houve uma diminuição do interesse da proposta de Raab [4-7].

A terapia fotodinâmica (TFD), (do inglês, *Photodynamic Therapy*, PDT) é uma técnica terapêutica alternativa não invasiva utilizada para o tratamento de diversas disfunções no tecido biológico, tais como o câncer e condições pré-cancerígenas, como também para diferentes patologias de origem bacteriana, viral, fúngica e inflamatória. É uma modalidade terapêutica que se baseia no uso de três componentes: um fotossensibilizador (FS), luz e o oxigênio molecular presente na célula a ser tratada ou inativada [5]. A reação da TFD começa quando uma luz com comprimento de onda apropriado é absorvida pela molécula do FS. O fotossensibilizador é promovido para o estado excitado singleto e após alguns processos interage com o meio biológico transferindo energia para o oxigênio molecular no estado tripleto, promovendo-o para o estado singleto altamente reativo. São, então, produzidas espécies citotóxicas prejudiciais às células levando-as à morte [8-11].

O aumento global de bactérias resistentes a antibióticos tem levado a um grande esforço no sentido de desenvolver novas estratégias terapêuticas que sanem esta deficiência. Devido ao risco de resistência do microrganismo ao antibiótico e a toxicidade de terapias antibióticas atuais, tem havido uma tendência para a descoberta de novas opções de tratamentos antimicrobianos. Uma dessas opções é o uso da TFD, porém quando as células a serem inativadas são microrganismos patogênicos o procedimento é denominado Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFA) (em inglês, *Antimicrobial Photodynamic Therapy* - aPDT) ou Inativação Fotodinâmica (IFD) [5, 12, 13].

Quando o fotossensibilizador é ativado por luz visível, pode reagir com as moléculas da sua vizinhança por transferência de elétrons ou transferência de hidrogênio, levando à

formação de radicais livres (reação tipo I) ou por transferência do excesso de energia ao oxigênio molecular (reação tipo II), resultando na produção do oxigênio singleto. Dependendo do tipo de célula e do fotossensibilizador o oxigênio singleto reage com as moléculas envolvidas na manutenção da estrutura da membrana celular tais como fosfolipídios e peptídeos. Os processos fotodinâmicos podem também danificar o DNA quebrando as bases de ligações por oxidação causando a morte celular [10]. As duas reações podem levar à morte celular ou à destruição do tecido. Durante esse processo, ocorrem reações fotoquímicas e fotofísicas. Uma das interações fotoquímicas é a absorção, pelo FS, do comprimento de onda adequado da luz que o ilumina para sua excitação. Já as interações fotofísicas, formam constantes de velocidade que contribuem para os processos de decaimento do estado excitado singleto para o estado fundamental como o relaxamento radiativo (fluorescência, F), o relaxamento não radiativo tipo conversão interna (CI), e o não radiativo tipo cruzamento intersistema (CIS) para o estado excitado tripleto [3, 14, 15].

Um FS natural que está sendo usado para a terapia fotodinâmica é a Cúrcuma, também conhecida como açafrão, açafrão da terra, gengibre dourado e mangarataia. É uma planta de nome científico *Curcuma longa* L., pertencente à família Zingiberaceae. A parte da planta que é utilizada para a produção da droga fotossensível é o rizoma, de onde são extraídos três curcuminóides: a curcumina, a demetoxicurcumina e a bisdemetoxicurcumina. Na literatura, a Curcumina tem sido descrita como possuindo inúmeros efeitos antimicrobianos, anti-inflamatórios, imunomoduladores, entre outros e que quando usada como droga fotossensibilizadora, ao ser fotoativada causa grandes danos podendo levar à morte celular. Uma versão modificada da Curcumina que tem sido usada é o sal de curcumina (sintetizado pela PDT Pharma de Cravinhos - SP). Essa formulação especial da Curcumina é sintetizada para que se torne solúvel em água, porém mantendo todas as suas propriedades [16-18].

Nas últimas décadas foi comprovado a capacidade de inativação de microrganismos do tipo *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus epidermidis*, utilizando a curcumina como FS na IFD [19-21]. Estes microrganismos são a causa de várias doenças que vão da mais simples, como a acne, até as mais complexas, como a meningite, pneumonia, intoxicação alimentar entre outras, podendo levar o indivíduo a óbito se não forem tratadas adequadamente [22-24].

O *Staphylococcus aureus* pode causar uma variedade de infecções, mais notadamente na pele, tecidos moles, ossos e infecções na corrente sanguínea. Essa é também a causa mais comum de infecções de feridas pós-operatórias. Algumas cepas de *S. aureus* produzem fatores tóxicos que podem causar uma variedade de sintomas específicos, incluindo a síndrome do

choque tóxico e intoxicação alimentar [25]. A contaminação de um alimento por este microrganismo pode ocorrer de diversas maneiras, a mais comum é através do contato direto com o ser humano. Por exemplo, a ordenha do leite na maioria das vezes é feita manualmente, com isso o risco de ser contaminado é muito grande, além do fato desse leite ser um dos meios mais ricos em nutrientes o que acaba atraindo diversos microrganismos que tem seu crescimento favorável nesse meio.

Neste trabalho é proposto avaliar a inativação microbiana do *Staphylococcus aureus* presente no leite cru e no leite pasteurizado através da IFD, buscando encontrar as condições ótimas de inativação, como por exemplo, a concentração de FS mais eficaz e a conjugação de potência incidente e tempo de irradiação que forneça doses adequadas para a maior eficiência da inativação fotodinâmica.

Para o planejamento do experimento e análise dos resultados da inativação bacteriana via IFD, se faz necessário um embasamento teórico sobre a interação da luz com meios túrbidos, com detalhamento sobre absorção e espalhamento de luz em meios biológicos. Essa base encontra-se no capítulo 2 desta dissertação e nos possibilitará entender a penetração da radiação nas soluções que contém os microrganismos e o comportamento da inativação para as diversas variantes estudadas.

No capítulo 3 é apresentado o conceito da TFD e da IFD. Detalharam-se os processos responsáveis pela inativação, apresentando o sal de curcumina e suas diversas aplicações como fotossensibilizador. Ainda nesse capítulo é descrito o microrganismo a ser inativado e os meios onde ele estará incorporado, os quais são o leite cru e o leite pasteurizado.

Todo o procedimento adotado, a fonte de luz utilizada na inativação, a escolha da melhor diluição de *S. aureus*, os testes usados para sondar os resultados, a estatística adotada na análise dos dados e o protocolo de inativação, encontram-se no capítulo 4.

O capítulo 5 relata todos os resultados encontrados e apresenta discussões sobre cada etapa realizada. Finalizando no capítulo 6 onde faremos as devidas conclusões.

1.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficiência na inativação do *Staphylococcus aureus* presente no leite cru e no leite pasteurizado, utilizando como FS o Sal de Curcumina e luz LED em 450 nm na Inativação Fotodinâmica (IFD).

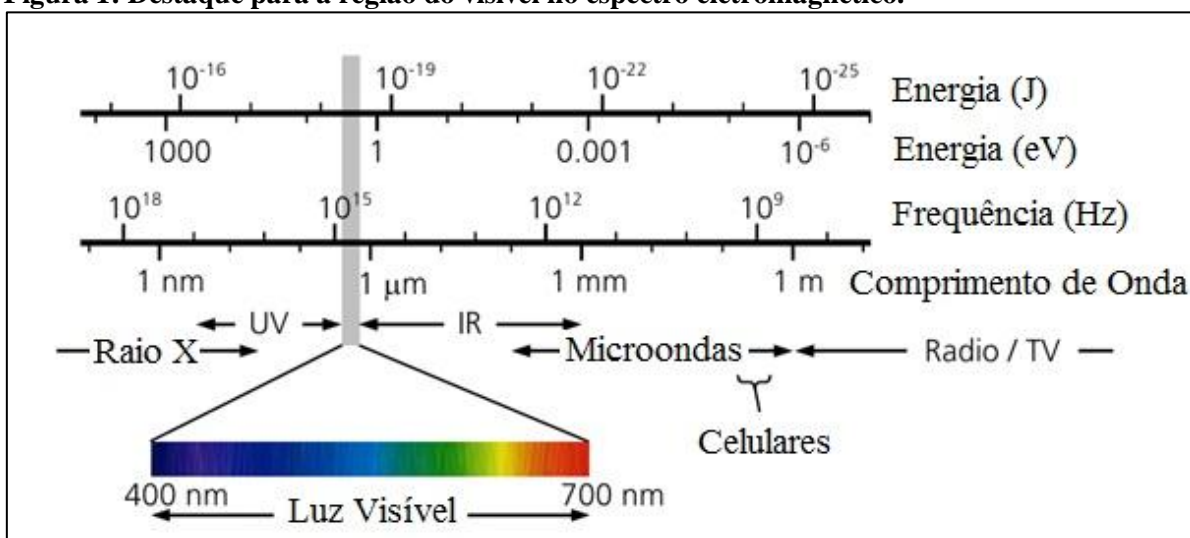
1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Inativar o microrganismo *Staphylococcus aureus* usando a Inativação Fotodinâmica (IFD).
- ✓ Encontrar os melhores parâmetros (diluição do microrganismo, concentração do FS, potência da luz incidente e tempo de irradiação da amostra e com isso a melhor dose) de inativação do *Staphylococcus aureus* no leite cru e leite pasteurizado.

2 INTERAÇÃO DA LUZ COM MEIOS BIOLÓGICOS

O termo luz refere-se genericamente à porção do espectro eletromagnético que pode ser vista a olho nu, compreendida no intervalo de comprimentos de onda de 400 a 700 nm, representada pela área em destaque na figura 1. Denomina-se de radiação eletromagnética aquela composta de campos elétricos e magnéticos oscilantes que podem se propagar através de um meio ou no vácuo. Também pode ser descrita como pacotes de energia chamados *fótons* ou *quanta* de energia, caracterizando o comportamento dual (onda-partícula) da luz [26-28].

Figura 1: Destaque para a região do visível no espectro eletromagnético.



Fonte: Adaptado do SHARMA, 2006 [29].

Para luz de frequência específica f podemos associar um valor de energia hf . Os valores de energia são discretos (não variam continuamente) e a menor energia de uma onda eletromagnética é igual à energia de um fóton,

(2.1)

$$E = hf,$$

onde h é a constante de Planck ($6,6 \times 10^{-34}$ Js) e f a frequência em Hertz. Escrevendo a frequência f em função da velocidade da luz c ($3,0 \times 10^8$ m/s) e do comprimento de onda λ (m), temos:

(2.2)

$$f = \frac{c}{\lambda}.$$

Substituindo (2.2) em (2.1), temos que:

(2.3)

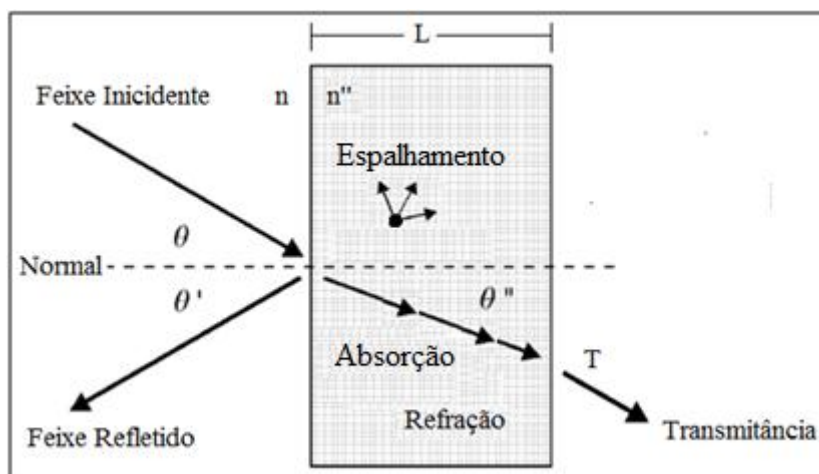
$$E = \frac{hc}{\lambda(m)} = E \cdot q_e .$$

Sendo as energias descritas em duas unidades, Joule (J) e em elétron-Volt (eV), q_e é a unidade de carga do elétron ($1,6 \times 10^{19}C$).

A utilização da luz como ferramenta de diagnóstico e tratamento na área das ciências da vida (Biofotônica) apresenta um comportamento crescente nas últimas décadas. Trata-se das aplicações da interação da luz com meios biológicos, como é o caso da inativação de microrganismos (bactérias, fungos leveduras e vírus) usando a técnica de inativação fotodinâmica (IFD). Portanto, é importante o entendimento dessas interações para ser usada como base necessária a análise das respostas do meio biológico.

Na interação da radiação eletromagnética com a matéria, vários fenômenos podem ocorrer. Quando estas interações são tratadas a nível molecular, fenômenos como refração, reflexão, absorção e espalhamento ocorrem e modificam a maneira como essa luz irá se propagar no meio (figura 2) [26-28].

Figura 2: Geometria da reflexão, refração, absorção e espalhamento de um feixe de luz incidindo em um meio.



Fonte: Adaptado de NIEMZ, 2003 [26].

As propriedades físicas são importantes para descrever a propagação da luz no meio biológico [28]. Será descrito a seguir os processos de reflexão e refração juntos, pois estão fortemente relacionados com as Leis de Fresnel e depois será abordado a absorção e o espalhamento.

2.1 Índice de Refração

O índice de refração linear é uma propriedade fundamental de um meio. No meio homogêneo, o índice de refração linear descreve as propriedades ópticas dos meios lineares. Definida como a razão entre a velocidade da luz no vácuo e velocidade da luz no material, o índice de refração absoluto, n , [28] é dado por:

$$n = \frac{c}{v}, \quad (2.4)$$

sendo c a velocidade da luz no vácuo e v a velocidade da luz que penetra o meio.

2.2 Reflexão e Refração

Quando uma onda de luz se propaga em um material com um determinado índice de refração e encontra interface com um segundo material com um índice diferente, o caminho dessa luz é redirecionado. Em geral, uma superfície refletora é a fronteira física entre dois materiais de diferentes índices de refração, como por exemplo, o ar e o meio biológico. Considerando uma superfície polida, quando essa luz é refletida, mede-se o ângulo de incidência θ e o ângulo de reflexão θ' , como o desvio dos feixes em relação ao meio e verifica-se que θ é igual a θ' , como mostrado na figura 2 e dada pela equação (2.5) [26, 28, 29].

$$\theta = \theta'. \quad (2.5)$$

Geralmente a refração ocorre quando a luz atravessa a interface que separa dois meios de diferentes índices de refração. Essa separação originará uma mudança na velocidade do raio de luz incidente. A relação matemática que rege esse fenômeno de refração é conhecida como a lei de Snell, sendo dada pela equação (2.6) [26].

(2.6)

$$\frac{\text{sen } \theta}{\text{sen } \theta''} = \frac{v}{v''},$$

onde θ'' é o ângulo de refração, v e v'' são as velocidades de propagação da luz no meio antes e depois da superfície refletora, respectivamente. Sendo o índice de refração definido pela equação (2.4), substituindo em (2.6) temos:

(2.7)

$$n \text{ sen } \theta = n'' \text{ sen } \theta''.$$

Os processos de reflexão e refração são mecanismos que estão presentes conjuntamente. Porém nos meios biológicos não ocorrem somente esses dois processos. Ainda ocorrem a absorção e o espalhamento que serão detalhados abaixo, mostrando que os processos espalhadores são predominantes, mas comumente tem algum caráter absorvedor [30].

2.3 Absorção

Processos de absorção são importantes em aplicações terapêuticas quando a energia é o principal mecanismo que permite que a luz possa produzir efeitos físicos sobre um meio biológico para fins de tratamento. Esses processos de absorção envolvem um conceito importante na teoria quântica, o nível de energia, que é um estado quântico de um átomo ou molécula. A mudança de um estado de menor energia E_0 para outro de maior energia E_1 através da absorção, é caracterizado pela diferença de energia entre os dois níveis como mostrado na equação (2.8) [27, 28].

(2.8)

$$\Delta E = E_1 - E_0 = h\nu.$$

A absorção ocorre devido a átomos ou moléculas que compõem o meio absorverem a radiação incidente, após esse processo a energia pode ser convertida em energia cinética (vibracional e/ou rotacional), gerar calor ou produzir estados excitados. A capacidade que um meio tem de absorver a radiação eletromagnética depende de diversos fatores, como o comprimento de onda da radiação, a espessura da camada absorvente, parâmetros internos tais como a temperatura ou a concentração dos agentes absorvedores, porém principalmente pela

constituição eletrônica dos seus átomos e moléculas, pois durante o processo de absorção a intensidade da onda eletromagnética varia ao passar através de um meio. O campo elétrico da onda incidente é mostrado na equação (2.9) [26-28].

(2.9)

$$\vec{E} = |E_0|e^{(\vec{k}\cdot\vec{z}-wt)}$$

A maior parte da energia de oscilação associada ao campo incidente é dissipada em forma de calor, fazendo assim com que o movimento oscilatório diminua e que em um determinado momento a intensidade dessa luz no meio diminua até com que não se tenha mais absorção [27, 28].

Para uma análise mais localizada de como essa luz é absorvida por esse meio, o coeficiente de absorção μ_a pode ser definido pela seguinte relação [28]:

(2.10)

$$dI = -\mu_a I dz ,$$

sendo dI a variação diferencial da intensidade I que um feixe de luz colimado sofre ao percorrer um caminho infinitesimal dz através de um meio homogêneo, com coeficiente de absorção μ_a . Integrando a expressão (2.10) de I_0 até I temos:

(2.11)

$$I(z) = I_0 e^{-\mu_a z} ,$$

onde I é a intensidade em função da profundidade z e I_0 a intensidade incidente. Define-se, então, o comprimento de absorção ou livre caminho médio de absorção,

(2.12)

$$l_a = \frac{1}{\mu_a} ,$$

em que l_a corresponde à distância média que um fóton pode percorrer antes de ser absorvido.

Contudo, Beer pouco tempo depois, mostrou a relação entre o coeficiente de absorção μ_a (mm^{-1}) com a ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$) que é a concentração de um material absorvedor em um determinado meio [28],

(2.13)

$$\mu_a = \varepsilon_\lambda a ,$$

onde ε_λ é o coeficiente de extinção específico de uma substância em um determinado comprimento de onda λ .

Então se substituirmos (2.13) em (2.11) temos,

(2.14)

$$I = I_0 e^{-\varepsilon_\lambda a z} ,$$

que é a equação de Beer-Lambert. A fração de energia transmitida T pode ser calculada sendo a razão entre a intensidade transmitida I pela incidente I_0 :

(2.15)

$$T = \frac{I}{I_0} .$$

A absorvância (A) ou densidade óptica (DO), de um determinado meio é dada pela equação (2.16).

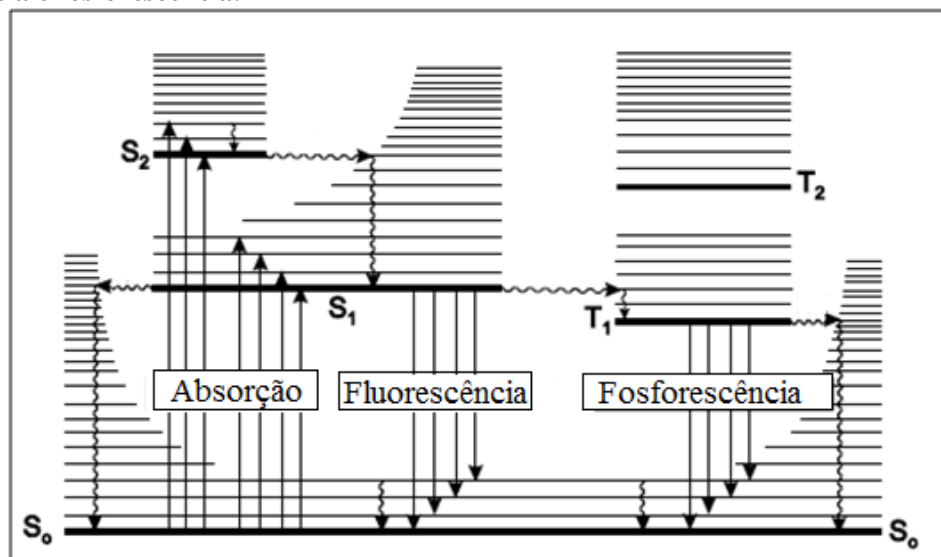
(2.16)

$$A = DO = \log_{10} \frac{I_0}{I} ,$$

$$A = -\log_{10} (T) .$$

Os coeficientes de extinção e absorção são equivalentes conceitualmente, pois, uma vez absorvida, por uma espécie molecular, a energia da luz pode ser opticamente dissipada pela emissão de um fóton, ou trocando energia cinética com outros graus de liberdade internos das espécies de absorção (por exemplo, "aquecimento" do meio). A situação mais comum é uma combinação dos dois processos, em que uma pequena quantidade da energia absorvida é dissipada e a maioria é emitida como um fóton na transição de volta para o estado fundamental. Este processo de emissão, conhecido como luminescência é dividido em fluorescência e fosforescência (figura 3) [26, 28, 31].

Figura 3: Diagrama Perrin-Jablonski para ilustração dos processos espectrais de absorção, fluorescência e fosforescência.



Fonte: Adaptado de VALEUR, 2002 [31].

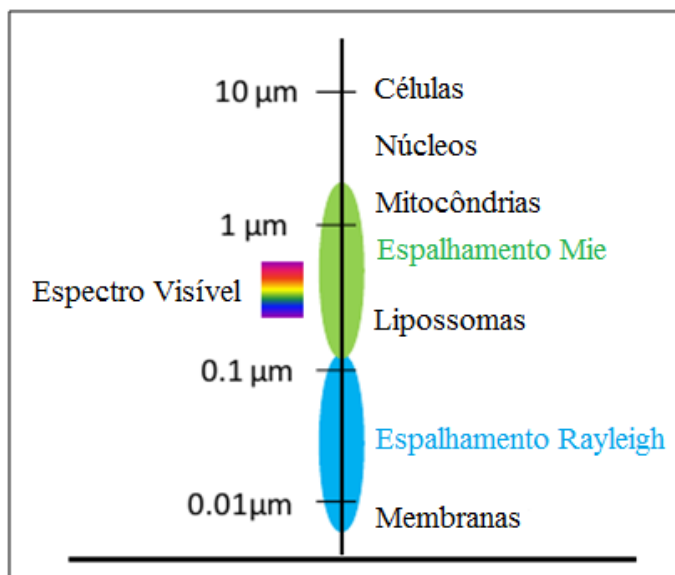
Na fluorescência o atraso entre a absorção e emissão é tipicamente da ordem de nanossegundos, enquanto que na fosforescência, a emissão ocorre muito mais tarde (milissegundos). Em tecidos o fenômeno mais comum é a fluorescência de estados excitados singleto, embora os estados tripleto estejam frequentemente envolvidos em terapia fotodinâmica, por exemplo [28].

2.4 Espalhamento

Várias teorias têm sido propostas para descrever o espalhamento da luz por partículas de diferentes formas e tamanhos. Em geral, estes se dividem em duas categorias: teoria da dispersão única e de múltiplas dispersões [32]. Isso ocorre, pois a maioria das estruturas celulares tem em sua formação água e compostos orgânicos criando assim organelas internas atuando como possíveis centros espalhadores. Olhando para essa dispersão do ponto de vista físico, existem essencialmente dois tipos de abordagens para a modelagem teórica do espalhamento em um meio biológico, que é bastante complexo e envolve vários mecanismos. Comumente no meio biológico ocorrem aqueles que estão relacionados com o comprimento de onda como o espalhamento Mie que descreve a dispersão da luz pelas estruturas que são da mesma ordem de grandeza que o comprimento de onda do fóton e o espalhamento Rayleigh que descreve a dispersão da luz pelas estruturas que são muito menores do que o comprimento de onda dos fótons. A figura 4 ilustra esses dois processos de espalhamento da luz visível e

infravermelha por estruturas biológicas. A maioria dos tratamentos a *laser* é feito na parte visível e infravermelho próximo do espectro da luz, onde os componentes subcelulares espalham essa luz [26, 28, 33].

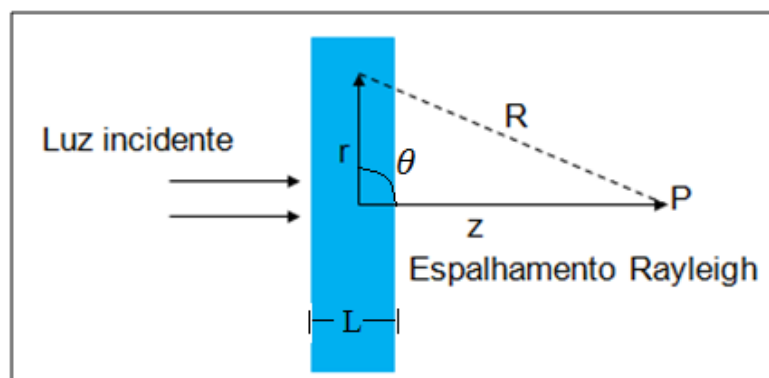
Figura 4: Espalhamento Mie e Rayleigh nas diferentes estruturas celulares.



Fonte: Adaptado de JACQUES, 1998 [34].

Como visto na figura 4 o espalhamento Rayleigh ocorre quando um feixe de luz encontra a membrana plasmática. Para esta dissertação isso é uma informação importante, pois a fonte de luz utilizada neste trabalho é um LED com comprimento de onda em 450 nm. Segundo Niemz [26], esse espalhamento é inversamente proporcional à quarta potência do comprimento de onda, como será mostrado a seguir.

Figura 5: Geometria simples do espalhamento Rayleigh.



Fonte: Adaptado de NIEMZ, 2003 [26].

A equação (2.17) mostra o campo elétrico de uma onda plana incidente formada por uma dispersão fina em um determinado momento (figura 5) [26].

(2.17)

$$E(z) = E_0 e^{ikz},$$

onde E_0 é a amplitude do campo incidente, k é o vetor propagação, e z o eixo óptico. Após o espalhamento existe uma perda de intensidade que pode ser descrita por uma relação similar à da absorção, isto é:

(2.18)

$$I(z) = I_0 e^{-\mu_s z},$$

sendo μ_s o coeficiente de espalhamento. Derivando a equação (2.18) em relação à z temos que:

$$\frac{dI(z)}{dz} = \frac{d}{dz} \{I_0 e^{-\mu_s z}\},$$

$$\frac{dI}{dz} = I(-\mu_s) e^{-\mu_s z} \Big|_{z=0},$$

$$\frac{dI}{dz} = -\mu_s I,$$

(2.19)

$$dI = -\mu_s I dz.$$

Podemos considerar que a intensidade dispersa por um meio fino de espessura L , como mostrado na figura 5 é proporcional à μ_s e L :

(2.20)

$$I_s \approx \mu_s L.$$

Pode ser assumindo que são NL átomos por unidade de área do espalhamento, onde N é a densidade de átomos espalhados. Então a intensidade espalhada por um átomo (I_1) pode ser descrita pela relação,

(2.21)

$$I_1 \approx \frac{\mu_s L}{NL} = \frac{\mu_s}{N},$$

ao definir o campo elétrico da onda incidente total como o campo elétrico para um único átomo. Podemos escrever o quadrado do campo elétrico sendo proporcional a intensidade dispersa para um átomo, como mostrado na equação abaixo (2.22):

(2.22)

$$E_1^2 \approx I_1 .$$

Substituindo a equação (2.21) em (2.22), temos que a amplitude do campo elétrico é correspondente à equação (2.23):

$$E_1^2 \approx \frac{\mu_s L}{N L} ,$$

(2.23)

$$E_1 \approx \sqrt{\frac{\mu_s}{N}} .$$

Devido à interferência de todas as ondas dispersas, temos:

(2.24)

$$E_s \approx N L \sqrt{\frac{\mu_s}{N}} = L \sqrt{\mu_s N} .$$

A amplitude da onda numa distância z sobre o eixo óptico é obtida pela soma das amplitudes de todas as ondas esféricas espalhadas, ou seja:

(2.25)

$$E(z) = E_0 e^{ikz} + E_0 E_s \int_0^\infty \frac{e^{ikR}}{R} 2\pi r dr ,$$

onde o primeiro termo da equação $E_0 e^{ikz}$ é o campo elétrico da onda incidente, no segundo termo E_s que é o valor do campo elétrico devido a cada contribuição espalhada e a integral $\int_0^\infty \frac{e^{ikR}}{R} 2\pi r dr$ é a integral que mostra a soma de todas as contribuições esféricas do campo elétrico. Então a equação 2.25 pode ser escrita como:

(2.26)

$$E(z) = E_0 \left(e^{ikz} + E_s \int_0^\infty \frac{e^{ikR}}{R} 2\pi r dr \right) .$$

Da figura 5 podemos retirar a relação mostrada na equação (2.27), que para um dado z se torna a (2.28).

$$R^2 = z^2 + r^2 \tag{2.27}$$

$$r \, dr = R \, dR \tag{2.28}$$

Substituindo a equação (2.28) em (2.26) temos que:

$$E(z) = E_0 \left(e^{ikz} + 2\pi E_s \int_{R_1}^{R_2} e^{ikR} \, dR \right). \tag{2.29}$$

Fazendo as substituições na equação (2.29), os limites da integral (R_1 e R_2) também mudaram. Da equação (2.27) os limites serão:

$$R^2 = z^2 + r^2 \tag{2.30}$$

$$\text{Para } r = 0, \text{ temos que } R_1 = z \tag{2.31}$$

$$\text{Para } r = \infty, \text{ temos que } R_2 = \infty$$

Substituindo as equações (2.30) e (2.31) na equação (2.29), temos que:

$$E(z) = E_0 \left(e^{ikz} + 2\pi E_s \int_z^{\infty} e^{ikR} \, dR \right). \tag{2.32}$$

Resolvendo a integral na equação (2.32), obtêm-se:

$$E(z) = E_0 \left[e^{ikz} + 2\pi E_s \left\{ \frac{1}{ik} (e^{ikz}) \Big|_z^{\infty} \right\} \right]. \tag{2.33}$$

Como o trem de ondas tem tamanho finito, $R \rightarrow \infty$ pode ser desprezado:

$$E(z) = E_0 \left(e^{ikz} - E_s \frac{2\pi}{ik} e^{ikz} \right). \quad (2.34)$$

Substituindo a equação (2.24) em (2.34), temos que:

$$E(z) = E_0 \left(e^{ikz} - L\sqrt{\mu_s N} \frac{2\pi}{ik} e^{ikz} \right), \quad (2.35)$$

mas, $\lambda = \frac{2\pi}{k}$ então

$$E(z) = E_0 e^{ikz} (1 + i\lambda L\sqrt{\mu_s N}). \quad (2.36)$$

Usando a expansão de $e^x = 1 + \frac{x}{1!} \dots$,

$$E(z) = E_0 e^{i(kz + \lambda L\sqrt{\mu_s N})}. \quad (2.37)$$

A fase da onda incidente é alterada por uma quantidade $\lambda L\sqrt{\mu_s N}$, devido ao espalhamento. Este valor é conhecido pela expressão do retardo de fase $\Delta\phi$, que ocorre quando a luz penetra em um meio com índice de refração n , então:

$$\Delta\phi = \frac{2\pi}{\lambda} (n - 1)L,$$

$$\lambda L\sqrt{\mu_s N} = \frac{2\pi}{\lambda} (n - 1)L,$$

$$(n - 1) = \frac{\lambda^2}{2\pi} \sqrt{\mu_s N},$$

$$\mu_s = \frac{(n - 1)^2 4\pi^2}{N \lambda^4}. \quad (2.38)$$

Substituindo (2.38) em (2.20), finalmente obtemos a lei de espalhamento de *Rayleigh* quando desprezamos a dependência de n com o comprimento de onda, ou seja,

$$I_s \approx \frac{1}{\lambda^4}. \quad (2.39)$$

Se o ângulo de espalhamento θ é levado em conta, temos que:

$$I_s(\theta) \approx \frac{1 + \cos \theta}{\lambda^4}, \quad (2.40)$$

onde $\theta = 0$ indica o espalhamento para frente.

2.5 Dispersão Anisotrópica

Uma vez que o meio biológico é constituído por estruturas em camadas não é difícil imaginar que este pode influenciar para que ocorra uma dispersão. A dispersão em um meio biológico tem sido mostrada como sendo um espalhamento frontal. A anisotropia g é a medida quantitativa do espalhamento para frente de um fóton depois de um único evento de espalhamento. Quando um fóton é disperso por uma partícula, de modo que a sua trajetória é desviada por um ângulo de deflexão θ , em seguida, a componente da nova trajetória é alinhada para frente na direção $\cos \theta$. O ângulo médio de deflexão ou o valor médio do ângulo de dispersão é $\langle \cos \theta \rangle$ [35-37].

O modelo foi introduzido por Henyey e Greenstein (1941) e pode ser usado para descrever a distribuição angular da luz espalhada por partículas pequenas. Este modelo foi aplicado para numerosas situações, que vão desde a dispersão da luz pelo tecido biológico à dispersão por nuvens de poeira interestelares [26, 37]. A equação que descreve o modelo Henyey-Greenstein da distribuição angular da luz espalhada a partir das partículas no meio biológico é mostrada abaixo, equação (2.41).

$$p(\theta) = \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cos \theta)^{\frac{3}{2}}} \quad (2.41)$$

onde g é o fator de anisotropia que determina a direção e o sentido do fóton incidente depois de um único evento de espalhamento e o $\cos \theta$ é a nova trajetória para frente desse fóton depois de ser espalhado.

2.6 Meios Túrbidos

No meio túrbido a luz é espalhada e absorvida devido à heterogeneidade e absorção característica do meio. Em sua maior parte, os meios biológicos são constituídos por meios túrbidos. A turbidez de um meio consiste em um meio não homogêneo e caracteriza-se pela impossibilidade da luz de se propagar em linha reta e com o módulo de velocidade constante quando o atravessa. Existe um coeficiente que descreve esse processo chamado de coeficiente de atenuação total e pode ser expresso pela seguinte equação [26, 38, 39]:

(2.42)

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s.$$

Em um meio túrbido, o caminho óptico médio de fótons livres incidentes é determinado por:

(2.43)

$$l_t = \frac{1}{\mu_t} = \frac{1}{\mu_a + \mu_s}.$$

sendo μ_a e μ_s os coeficientes de absorção e espalhamento, respectivamente de um meio.

Em diversos meios biológicos os fótons ao se propagarem através desse meio se comportam como funções aleatórias em comprimento e direção (o chamado caminho aleatório) que de acordo com a intuição de que se o espalhamento dominar a absorção, esses fótons espalham-se aleatoriamente (difundem-se) pelo tecido antes de serem absorvidos. Então dentro desse caminho aleatório temos o coeficiente de difusão, D , que mostra como esses fótons interagem com o meio, sendo definido como:

(2.44)

$$D = \frac{1}{3[\mu_a + (1 - g)\mu_s]^{\frac{3}{2}}}$$

Onde o g é o fator de anisotropia, já visto na equação (2.41), que determina a direção e o sentido do fóton incidente. Com isso, cada etapa começa com um evento de dispersão que é

igualmente provável para espalhar o fóton em qualquer direção. O coeficiente de espalhamento reduzido, μ_s' , descreve a difusão isotrópica, que está relacionada com o (anisotropia) coeficiente de espalhamento, μ_s , através de [28]:

$$(2.45)$$

$$\mu_s' = (1 - g)\mu_s .$$

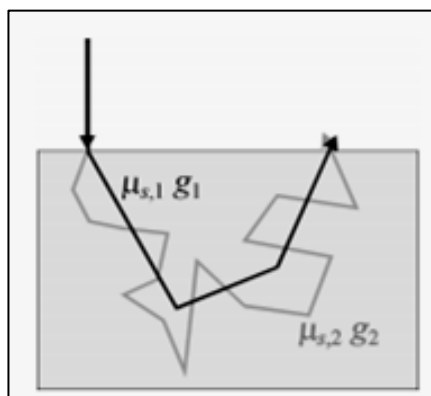
Então a equação (2.42) se transforma em:

$$(2.46)$$

$$\mu_t' = \mu_a + \mu_s' .$$

Como foi observado, se um fóton é detectado em um ponto específico no interior ou sobre a superfície de um meio, não é possível distinguir o caminho que o fóton tomou. Em uma forma específica com o coeficiente de dispersão reduzida, dois fótons podem ser detectados no mesmo ponto depois de tomar dois caminhos completamente diferentes, tal como ilustrado na figura 6 [37].

Figura 6: Princípio da similaridade, onde os fótons que tomam caminhos diferentes chegam ao mesmo ponto final.



Fonte: DAM, 2000 [37].

O princípio da similaridade, afirma que se dois meios forem iluminados por uma fonte de luz difusa terão uma distribuição de fótons semelhantes se a seguinte condição for verdadeira [40]:

$$(2.47)$$

$$\mu_{s1}' = \mu_{s2}' ,$$

$$(1 - g_1)\mu_{s1} = (1 - g_2)\mu_{s2} .$$

Ao saber o conjunto completo das propriedades ópticas (n , μ_a , μ_s e g) é possível fazer previsões bastante precisas do fluxo de luz em um meio biológico. Para muitas medições de luz no tecido biológico em distâncias relativamente longas da fonte, a luz torna-se difusa e perde o controle de sua direção inicial. Assim, não é possível separar μ_s e g . Isto levou ao desenvolvimento de modelos que dependem de parâmetros como μ_s' e μ_a , por exemplo, teoria da difusão em tecidos [26, 28, 37].

2.7 Mecanismos de Interação

Uma variedade de mecanismos de interação pode ocorrer quando se aplica a luz no meio biológico. Características específicas do meio, bem como parâmetros dessa luz contribuem para essa diversidade. As mais importantes propriedades ópticas dos tecidos são os coeficientes de refração, reflexão, absorção e espalhamento. Juntos, determinam a transmissão total do meio a um determinado comprimento de onda [26]. Ao lidar com essa interação entre a luz e o tecido biológico a quantidade de luz que irá atingir a área alvo é de importância primordial. A taxa de energia fornecida por unidade de área numa posição específica é chamada taxa de fluência (W/cm^2) e é por vezes referida como a taxa de exposição [41].

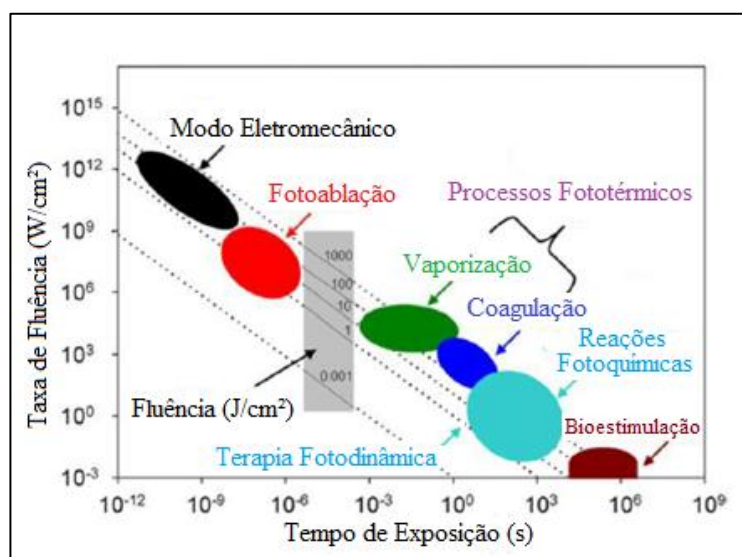
A interação da luz com o tecido pode ser dividida em seis categorias ou modos de interações listadas em ordem crescente de tempo de tratamento [42]:

- Modo Eletromecânico
- Fotoablação
- Vaporização
- Processos Fototérmicos ou Coagulação
- Reações Fotoquímicas (fotodinâmica)
- Bioestimulação

Os seis modos de interação são ilustrados na figura 7 mostrando que a taxa de fluência diminui em função do aumento do tempo de interação com o tecido e células. Nas aplicações com alta taxa de fluência, o tempo de tratamento é muito curto devido à alta intensidade da luz e os processos são geralmente de natureza ablativa/disruptiva. Para os tratamentos de

exposição mais longos, a taxa de fluência é muito inferior para evitar danos para as células [26, 42].

Figura 7: Relação entre a taxa de fluência e o tempo de exposição para diferentes modos de interação.



Fonte: Adaptado de PENG, 2008 [42].

No âmbito das interações fotoquímicas, destaca-se a terapia fotodinâmica [26]. Deve-se notar que para o estudo de uma luz *laser* em contato com o tecido biológico todos esses processos devem ser levados em consideração. Porém para esta dissertação será utilizado uma luz LED com potências baixas, considerando apenas os processos fotoquímicos (como exemplo a terapia fotodinâmica).

2.7.1 Interações Fotoquímicas

A Fotoquímica é uma área da química que estuda os efeitos químicos da luz, ou seja, é o estudo das reações químicas provocadas pela incidência de radiação eletromagnética. A Fotoquímica também estuda as reações químicas produzidas pela emissão de radiação eletromagnética, é a chamada luminescência. O grupo de interações fotoquímicas decorre de observações empíricas de que a luz pode induzir reações químicas dentro das macromoléculas ou tecidos. Um dos exemplos mais populares foi criado pela própria evolução: a liberação de energia devido à fotossíntese. No campo da Física, os mecanismos de interações fotoquímicas desempenham um papel significativo durante a terapia fotodinâmica (TFD). Frequentemente, a bioestimulação também é atribuída a interações fotoquímicas, embora isso não seja cientificamente verificada [11, 26].

Durante a terapia fotodinâmica, cromóforos espectralmente adaptados são injetados para dentro do corpo. Irradiação monocromática pode então desencadear reações fotoquímicas seletivas, resultando em certas transformações biológicas. Um composto cromóforo é capaz de causar reações induzidas por luz em outras moléculas absorvedoras, sendo chamado de fotossensibilizador. Depois da excitação ressonante por irradiação de luz com comprimento de onda específico, o fotossensibilizador executa vários decaimentos sequenciais que resultam em reações de transferência de energia intramolecular. No processo final destas transferências de energia para reagentes diferentes, eles se tornam altamente citotóxicos e são liberados causando uma oxidação irreversível em estruturas celulares essenciais [26, 43].

Assim, a ideia principal do tratamento fotoquímico é a utilização de um receptor para agir como um catalisador cromóforo. Os seus estados excitados devem ser capazes de armazenar energia transferida de absorção ressonante, e a sua desativação conduzir a compostos tóxicos, que são representados na tabela 1 com as principais reações fotoquímicas que acontecem na interação desses fotossensibilizadores com a radiação eletromagnética [5, 11, 26].

Tabela 1: Cinética de fotossensibilização (S: fotossensibilizador, RH: substrato com ligação-H, CAR: carotenoide).

Excitação	
• Absorção do Estado Singlete	${}^1S + h\nu \Rightarrow {}^1S^*$
Decaimentos	
• Decaimento Singlete Radiativo	${}^1S^* \Rightarrow {}^1S + h\nu'$ (Fluorescência)
• Decaimento Singlete Não Radiativo	${}^1S^* \Rightarrow {}^1S$
• Cruzamento Intersistema	${}^1S^* \Rightarrow {}^3S^*$
• Decaimento Triplete Radiativo	${}^3S^* \Rightarrow {}^1S + h\nu''$ (Fosforescência)
• Decaimento Triplete Não Radiativo	${}^3S^* \Rightarrow {}^1S$
Reações do Tipo I	
• Transferência de Hidrogênio	${}^3S^* + RH \Rightarrow SH^\bullet + R^\bullet$
• Transferência de Elétrons	${}^3S^* + RH \Rightarrow S^{\bullet-} + RH^{\bullet+}$
• Formação do Dióxido de Hidrogênio	$SH^\bullet + {}^3O_2 \Rightarrow {}^1S + HO_2^\bullet$
• Formação de Ânion Superóxido	$S^{\bullet-} + {}^3O_2 \Rightarrow {}^1S + O_2^{\bullet-}$
Reações do Tipo II	
• Troca Intramolecular	${}^3S^* + {}^3O_2 \Rightarrow {}^1S + {}^1O_2^*$
• Oxidação da Célula	${}^1O_2^* + \text{cell} \Rightarrow \text{cell}_{\text{ox}}$
Proteção Carotenóide	
• Extinção do Oxigênio Singlete	${}^1O_2^* + {}^1\text{CAR} \Rightarrow {}^3O_2 + {}^3\text{CAR}^*$
• Desativação	${}^3\text{CAR}^* \Rightarrow {}^1\text{CAR} + \text{heat}$

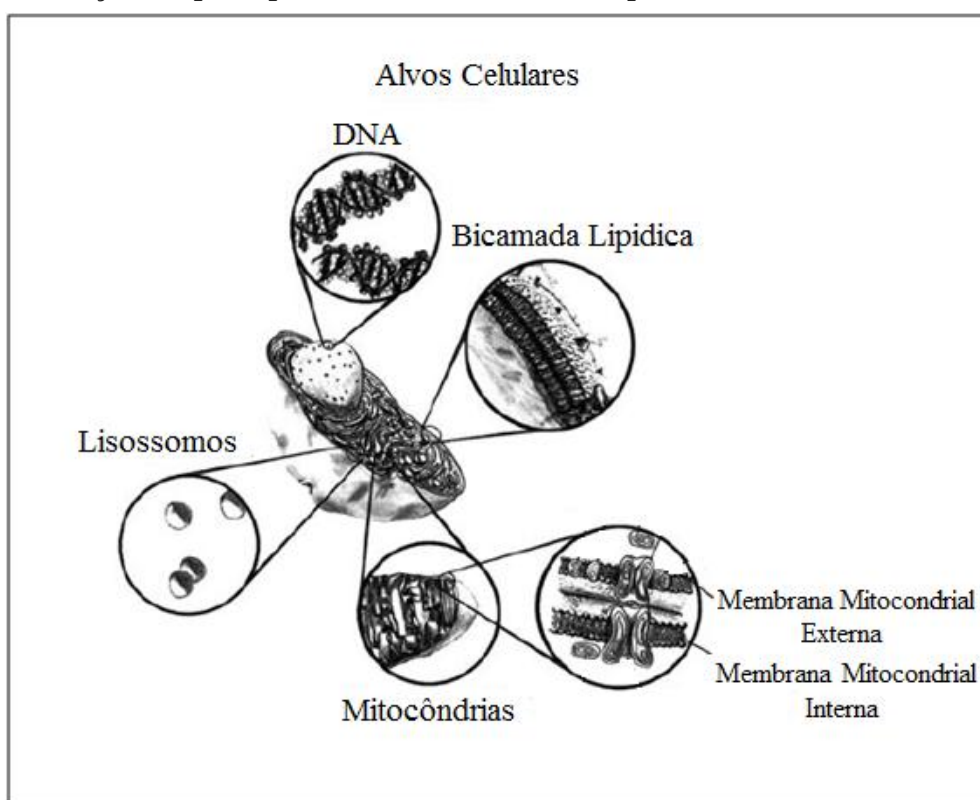
Fonte: Adaptado de BOULNOIS, 1986 [43].

No próximo capítulo, trataremos da terapia fotodinâmica (TFD) de uma maneira geral e sua outra denominação quando aplicada à inativação de microrganismos que a chamada Inativação fotodinâmica (IFD) ou Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT: do inglês *Antimicrobial Photodynamic Therapy*).

3 TERAPIA FOTODINÂMICA, INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA, FOTOSSENSIBILIZADOR, MICRORGANISMO E MEIO INVESTIGADO.

A terapia fotodinâmica (TFD), (do inglês, *Photodynamic Therapy*, PDT) é uma técnica terapêutica alternativa não invasiva utilizada para o tratamento de diversas disfunções no tecido biológico, tais como o câncer e condições pré-cancerígenas e também para diferentes patologias de origem bacteriana, viral, fúngica e inflamatória, que faz uso da luz e uma substância fotoativa para causar dano oxidativo à célula (figura 8).

Figura 8: Ilustração dos principais alvos celulares afetados pela TFD.



Fonte: Adaptado de VO-DINH, 2003 [28].

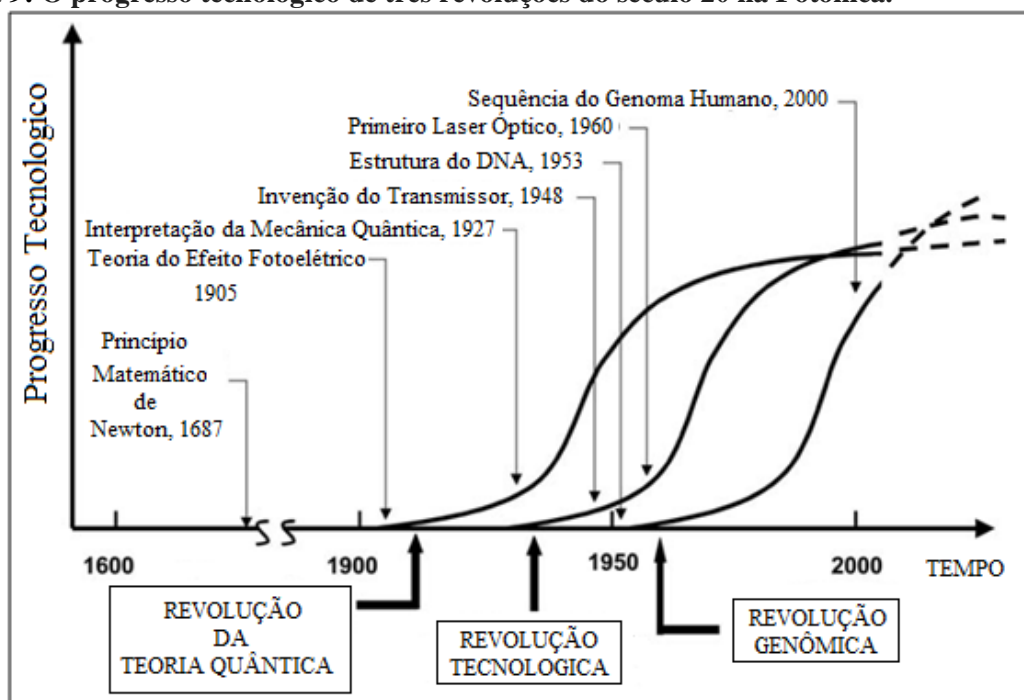
Essa terapia baseia-se no princípio de que uma substância (o fotossensibilizador, FS) se liga à célula-alvo e pode ser ativado, por luz de um comprimento de onda adequado. Durante os processos fotoquímicos e fotofísicos, são formados radicais livres, que em seguida, produzem um efeito que é tóxico para a célula [1-3, 5].

3.1 Histórico

Historicamente a utilização da luz e compostos fotossensíveis pelo ser humano como forma de tratamento é realizado desde o antigo Egito. Civilizações antigas como a Índia, Egito e China, usavam a ação fotodinâmica através da ingestão de plantas contendo psoralenos, associadas à exposição da luz solar, para tratamento de doenças de pele, como vitiligo e psoríase, o que o filósofo grego Heródoto chamava de Helioterapia, pois, geralmente esses tratamentos eram realizados na Heliópolis, uma cidade grega conhecida como a “Cidade do Sol”. Era uma verdadeira cidade da cura, onde seus tratamentos eram realizados pela luz e como consequência foram construindo diversos templos de cura onde se praticava essa terapia solar utilizando suas componentes espectrais [1-3].

Em aproximadamente 1900 o desenvolvimento da teoria quântica auxiliou um maior entendimento da natureza da luz, o que beneficiou significativamente o campo da Fotônica (figura 9).

Figura 9: O progresso tecnológico de três revoluções do século 20 na Fotônica.



Fonte: Adaptado de VO-DINH, 2003 [28].

Com isso os estudos em relação à biofotônica voltaram a progredir com a introdução de uma substância fotoativa. No fim de 1900, Oscar Raab quando observou que ao decorrer de uma tempestade e exposição a muitos raios, alterações das condições luminosas do

ambiente no momento dos experimentos interferiram com a sobrevivência dos protozoários, apontando que o efeito observado era causado pela transferência de energia da luz para a substância química cloridrato de acridina (um corante) contra *Paramecium caudatum* (protozoário causador da malária) quando comparada com seus efeitos em um dia normal. Ele começou a relacionar a dependência do dano observado com a quantidade de luz, publicando assim o primeiro artigo sobre esses efeitos de compostos químicos a exposição da luz [4-7]. No ano seguinte, 1901, o médico neurologista francês Jodlbauer Prime tratou a epilepsia de uma paciente com eosina via oral, tendo como achado clínico a indução de dermatite nas áreas expostas à luz solar [47].

Após dois anos, em 1903, Von Tappeiner e Albert Jesionek, começaram a realizar o tratamento de carcinomas de células basais com a aplicação de solução 5% de eosina, por via tópica e posterior exposição à luz branca ou à luz solar. Então o termo *Photodynamische Wirkung* (em português, efeito fotodinâmico) foi cunhado, por Von Tappeiner e Jodlbauer, para todas as reações fotobiológicas envolvendo um fotoabsorvedor [4, 48, 50].

Diversos estudos avaliando efeitos de fotossensibilidade e fototoxicidade, bem como farmacodinâmica e farmacocinética de fotossensibilizadores, foram descritos a partir daí. Em 1908, houve uma grande evolução referente à aplicabilidade da TFD, quando os primeiros casos envolvendo o uso de porfirinas como agentes fotossensibilizadores foram descritos. Em 1975, ocorreu um dos avanços mais importantes da terapia fotodinâmica, quando o médico Dougherty e outros obtiveram resposta completa no tratamento do tumor no cérebro de um rato com uso de derivado de hematoporfirina (HpD) e fonte de luz vermelha. Com isso, o urologista J. F. Kelly, em Londres, demonstrou que células tumorais de bexiga humana transplantadas em ratos poderiam ser tratadas e inativadas [50-52]. Com todas as pesquisas desenvolvidas nesse período, a Terapia Fotodinâmica passou a ser reconhecida como uma alternativa para o tratamento de câncer e empregada com sucesso no tratamento de tumor.

Paralelamente a todos esses avanços que investigavam a aplicabilidade da terapia fotodinâmica, Albert Einstein publicou, em 1916, uma teoria denominada “os princípios da luz pela emissão estimulada de radiação”, que serviriam de base posteriormente para os estudos que culminaram no desenvolvimento, em 1960, por Theodore Maiman, do primeiro dispositivo batizado de *Laser*, uma abreviação de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, proporcionando, assim, o desenvolvimento de uma série de pesquisas envolvendo a interação luz e tecido. Com isto as décadas de 50 e 60 foram marcadas por esses avanços tecnológicos principalmente no que se dizia respeito à Terapia Fotodinâmica, que se iniciaram com a descoberta da primeira geração de fotossensibilizadores, os derivados de

hematoporfirina e seus análogos comerciais como Photosan®, Photofrin® e Photogem®, tendo como o primeiro pesquisador Sam Schwartz [11, 28, 53-54].

O ano de 1976 foi marcado pelo postulado de que o oxigênio singleto gerado por sensibilização, a partir da transferência da energia do agente fototerapêutico no estado tripleto excitado para o oxigênio molecular no estado fundamental, era o agente citotóxico responsável pela morte celular. Além de todos os efeitos fotoquímicos que são uteis no tratamento de cânceres, há vários outros métodos fotodinâmicos de indicações médicas já em uso habitual ou em estudos experimentais em diversas áreas. Além disso, microrganismos tais como bactérias, fungos, leveduras e vírus também podem absorver e serem inativados por luz visível apropriada [5, 55, 56].

3.2 Mecanismos da Terapia Fotodinâmica (TFD)

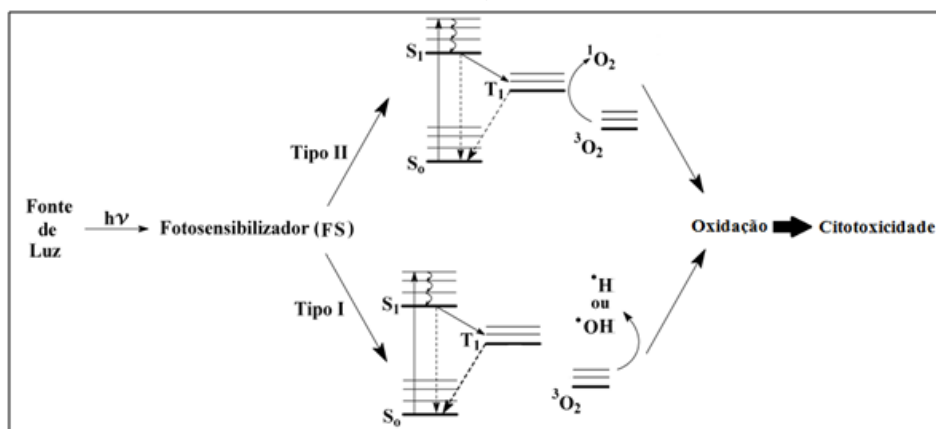
A terapia fotodinâmica, em nível molecular, em muitos casos, está bem descrita. É uma modalidade terapêutica que se baseia no uso de três componentes: um fotossensibilizador (FS), luz e o oxigênio molecular presente na célula a ser tratada ou inativada [5]. A reação da TFD começa quando uma luz com comprimento de onda ressonante é absorvida pela molécula do FS levando-o para o estado excitado singleto, que em última análise conduz à produção de espécies citotóxicas prejudiciais às células [8-11].

Esse processo inicia-se com a absorção da luz (fótons) pelo estado fundamental (S_0) do fotossensibilizador (FS), que resulta em sua excitação levando-o para o seu primeiro estado singleto excitado de curta duração (S_1). O fotossensibilizador pode voltar ao estado fundamental emitindo a energia absorvida no processo por fluorescência ou um processo não radiativo de conversão interna. Esta propriedade de fluorescência pode ser utilizada para avaliar a localização intracelular do FS nas células tumorais, ou também para vários tipos de diagnósticos [2, 3, 5, 86]. Outro caminho para a desativação do estado (S_1) é converter o FS para o primeiro estado excitado tripleto (T_1) em um processo não radiativo de cruzamento intersistema. O estado (T_1) é crucial no efeito do fotossensibilizador. Uma vez no estado excitado (S_1), o FS pode retornar ao seu estado fundamental por via de dois processos: radiativos (fluorescência ou fosforescência) ou não radiativos (conversão interna, cruzamento intersistema ou relaxações vibracionais), (Figura 10) [2, 14, 87].

O estado fundamental do FS tem dois elétrons com spins opostos, conhecido como estado singleto. Após a absorção da luz, um desses elétrons é levado para um orbital de mais alta energia, mas mantém seu spin (primeiro estado excitado singleto). Esta é uma espécie de

vida curta, com tempo de vida de nanosegundos, que é um tempo muito curto para qualquer interação significativa acontecer com as moléculas vizinhas. Dentre os processos de decaimento energético, o cruzamento intersistema é fundamental para a terapia fotodinâmica (transição proibida por spin, onde o fotossensibilizador no estado eletrônico excitado singlete (S_1) sofre uma transição para o estado excitado tripleto (T_1)). O fotossensibilizador no estado excitado tripleto apresenta um tempo de vida muito maior do que no estado excitado singlete, em razão da transição $T_1 \rightarrow S_1$ ser proibida por spin. Dessa forma, o FS no estado T_1 pode interagir quimicamente com moléculas vizinhas (por exemplo, o oxigênio molecular (3O_2), ou substratos) que iram conduzir à produção de EROs (Espécies Reativas de Oxigênio) nas reações do tipo II, iniciando assim, a fotodestruição dos tecidos, que pode ocorrer através da geração de radicais livres extremamente reativos (mecanismo tipo I) ou de oxigênio singlete (mecanismo tipo II) das reações fotoquímicas [14, 15, 93, 94].

Figura 10: O diagrama de Jablonski mostra os mecanismos de geração de EROs pela combinação de luz, fotossensibilizador (FS) e oxigênio no estado fundamental (3O_2).



Fonte: Adaptado de RIBEIRO, 2007 [95].

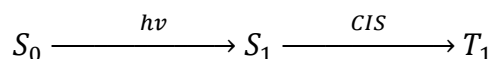
3.2.1 Reação do Tipo I

Nas reações do tipo I o estado excitado tripleto do FS (T_1) reage diretamente com substratos biológicos R (fosfolipídios, proteínas, colesterol entre outros), via transferência eletrônica ou transferência de hidrogênio. Uma reação do tipo I com água no meio microbiano pode dar origem à transferência de prótons ou elétrons, gerando íons radicais que tendem a reagir com o oxigênio molecular no estado fundamental, formando espécies reativas de oxigênio (EROs), como radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radical hidroxila ($^{\circ}OH$), que são ativos na oxidação de diversas biomoléculas [5, 10, 11].

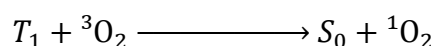
3.2.2 Reação do Tipo II

O FS no estado excitado tripleto (T_1) (equação 3.1) pode reagir com moléculas de oxigênio no estado fundamental tripleto (3O_2) e em sua vizinhança, via processo de transferência de energia, levando à produção de oxigênio singleto (1O_2), espécie mais reativa de oxigênio (equação 3.2). O oxigênio singleto reage com quase todos os componentes celulares uma vez que os compostos orgânicos insaturados são, de forma geral, suscetíveis à ação de (1O_2). Por esta razão as reações de transferência de energia são mais rápidas do que as reações de transferência de elétrons, o mecanismo tipo II é geralmente é mais provável de ocorrer nas reações de fotoxidação. Cada molécula do fotoabsorvedor pode produzir tipicamente de 10^3 a 10^5 moléculas de (1O_2) antes de ser degradada através de reação de fotodegradação (em inglês, *photobleaching*) que é a decomposição ou dissociação de compostos químicos causados pela luz ou por algum outro processo (equação 3.3) [5, 88, 89].

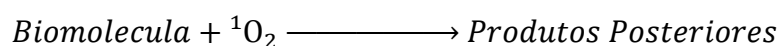
(3.1)



(3.2)



(3.3)



O oxigênio singleto é capaz de oxidar uma variedade de moléculas de substrato rico em elétrons, tal como lipídios poliinsaturados, colesterol, proteínas e bases de ácidos nucleicos, especialmente guanina [90]. Oxigênio singleto reage facilmente com os aminoácidos que contém ligações duplas [10].

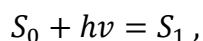
O mecanismo de ação está claramente relacionado com o local onde o FS situa-se, e a área onde o microrganismo reside para ser exposto à luz. Isto se deve ao fato de que o tempo de vida do oxigênio singleto é curto nas células, menos de $0,05 \mu s$. Assim, o oxigênio singleto pode difundir-se a menos de $0,02 \mu m$ a partir do local de produção. A ação da TFD pode causar vários danos às organelas celulares, tais como mitocôndrias, lisossomos, membrana celular e os microtúbulos, dependendo da localização subcelular do FS, a qual é um fator chave para o resultado da TFD, para além da determinação local do dano. Por exemplo, danos nas membranas das células podem reduzir o potencial metastático das células sobreviventes, dano nos microtúbulos pode levar a uma acumulação de células em mitose e

subsequentemente à morte, uma vez que o núcleo da célula não é um local de acumulação favorável para a maior parte dos FSs, e devido ao curto tempo de vida do oxigênio singlete [10, 91].

3.2.3 Interações Fotoquímicas e Fotofísicas na TFD

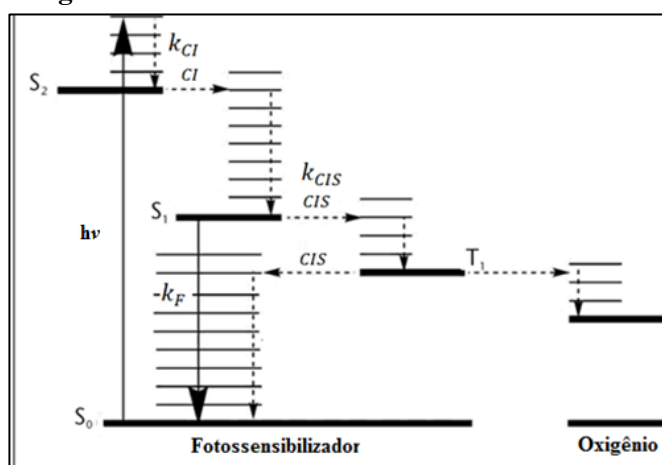
Um dos princípios básicos ou primeira lei das interações fotoquímicas é que para iniciar um processo fotodinâmico, o FS deve absorver energia no comprimento de onda ressonante da luz que o ilumina para sua excitação (estados singlete ou tripleto) (equação 3.4). Além disso, os fótons de energia devem ser suficientes para produzir excitação eletrônica da molécula. Dependendo do tipo de FS, essa energia pode ser na região espectral do ultravioleta (UV), visível (VIS), ou do infravermelho próximo (NIR) [3, 26].

(3.4)



Durante esse tempo se a molécula não sofrer nenhum tipo de rearranjo ou não se fragmentar é considerado um processo químico, se ela de alguma forma perder energia e retornar ao estado fundamental, temos um processo físico. Há diferentes possibilidades físicas para o retorno dessa molécula ao seu estado de mais baixa energia. Alguns processos poderão ser mais favorecidos que outros, dependendo do tipo de molécula e da natureza dos estados excitados envolvidos no processo, como mostrados na figura 11 [3, 11, 92].

Figura 11: O diagrama de Jablonski mostra os níveis de energia envolvidos na TFD, transições eletrônicas, associadas a agentes fotodinâmicos.



Fonte: Adaptado de HAMBLIN, 2008 [3].

Existem constantes de velocidade que descrevem os processos de decaimento do estado S_1 para o estado S_0 como o relaxamento radiativo (fluorescência, F), o relaxamento não radiativo conversão interna (CI), e o não radiativo cruzamento intersistema (CIS) para o estado T_1 [3, 93].

As constantes representadas no diagrama de Jablonski (figura 11) para diferentes níveis de energia são definidas como:

(3.5)

k_F = constante de velocidade associada a *Emissão de Fluorescência*.

(3.6)

k_{CI} = constante de velocidade associada a *Conversão Interna*.

(3.7)

k_{CIS} = constante de velocidade associada ao *Cruzamento Intersistema*.

É evidente que a partir da descrição mostrada anteriormente existem dois estados eletrônicos excitados que são de interesse na TFD. O estado S_1 é primariamente de interesse, pelo fato de que uma proporção menor do estado S_1 é desativado por relaxamento radiativo para o estado fundamental, em que um fóton de luz é emitido e corresponde à transição de $S_1 - S_0$. O Relaxamento radiativo entre estados é formalmente designado de "fluorescência". Os fotossensibilizadores comumente usados na TFD e em estudos experimentais têm apreciável fluorescência e essa propriedade é uma ferramenta muito útil para imageamento de tumores, determinando a farmacocinética da droga e a avaliação da dosimetria da TFD [3].

O tempo de vida de uma entidade molecular, que decai por uma cinética de primeira ordem, é o tempo necessário para a concentração da entidade diminuir a $1/e$ do seu valor original [93]. Então o tempo de vida ou taxa de relaxação do estado S_1 é igual ao inverso da soma das constantes de velocidade de primeira ordem de todos os processos que provocam o decaimento da entidade molecular. Esse processo pode ser descrito pela seguinte equação:

(3.8)

$$\tau_s = \frac{1}{\sum_i k_i^s},$$

onde τ_s é o tempo de vida do estado S_1 e $\sum_i k_i^s$ a soma das constantes que contribuem para o decaimento. A taxa de decaimento global do estado S_1 pode ser calculada substituindo as constantes de velocidade na equação (3.8), encontrando o tempo de vida do estado S_1 como:

(3.9)

$$\tau_s = \frac{1}{k_F + k_{CI} + k_{CIS}}.$$

Moléculas excitadas podem perder sua energia através de processos físicos ou participar de reações químicas. Para quantificar cada um destes processos utiliza-se a medida do rendimento quântico (Φ_R), que é a razão entre quantidade de reagente consumido ou produto formado (número de fótons emitidos) (N_e^a) em um processo específico, pelo número de fótons absorvidos (N_a^a) nesse mesmo processo [3, 11, 93].

(3.10)

$$\Phi_R = \frac{N_e^a}{N_a^a},$$

No processo em que a luz é constantemente irradiada será considerado em uma direção que o rendimento quântico para a fluorescência será (equação (3.13)):

(3.11)

$$N_e^a = k_F = \textit{Constante de velocidade que contribui para a fluorescência.}$$

(3.12)

$$N_a^a = \sum_i k_i^s = \textit{Soma das constantes que contribuem para o decaimento de } S_1 \textit{ para } S_0.$$

Substituindo (3.11) e (3.12) em (3.10), ficamos com:

(3.13)

$$\Phi_F = \frac{k_F}{\sum_i k_i^s},$$

Das equações (3.8) e (3.13) obtemos:

(3.14)

$$\Phi_F = k_F \cdot \tau_s,$$

Então inserindo (3.9) em (3.14), obtemos:

(3.15)

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{CI} + k_{CIS}}.$$

A soma dos rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F), conversão interna (Φ_{CI}) e do cruzamento intersistema (Φ_{CIS}) é tipicamente resolvido em solução simples. Para a maioria dos agentes fotodinâmicos a diferença de energia entre os estados de energia S_1 e S_0 é grande, porém a diferença entre S_1 e T_1 é pequena, então como resultado disso o processo de conversão interna é mínimo, sendo o cruzamento intersistema predominante $\Phi_{CIS} > \Phi_F > \Phi_{CI}$ e $\Phi_F + \Phi_{CIS} \approx 1$ [3]. Apresentamos a tabela 2 com tempos de vida característicos de processos de absorção e emissão de fótons.

Tabela 2: Tempos característicos dos processos associados à absorção e a emissão de fótons:

<i>Processo</i>	<i>Tempo característico (s)</i>
Absorção	10^{-15}
Relaxação vibracional	$10^{-12} - 10^{-10}$
Tempo de vida do estado excitado S_1	$10^{-10} - 10^{-7}$
Cruzamento intersistema	$10^{-10} - 10^{-8}$
Conversão interna	$10^{-11} - 10^{-9}$
Tempo de vida do estado excitado T_1	$10^{-6} - 10^0$

Fonte: Adaptado de HAMBLIN, 2008 [3].

3.2.4 Dosimetria

A TFD pode ser aplicada em diversos estudos, porém é necessário um conhecimento prévio dos mecanismos fundamentais para sua aplicação. A dosimetria é um aspecto muito importante nesse estudo. Ela permite uma distribuição de dose, uniforme ou não, sobre a área do meio biológico alvo na ação fotodinâmica. Uma medida essencial é a dose de luz aplicada no momento da terapia e para isso é necessário conhecer o comprimento de onda (λ), o regime de operação da luz (contínua ou pulsada), o tempo de irradiação do tecido (dado em segundos), a fluência/dose (ou densidade de energia) e a taxa de fluência ou intensidade [101, 103]. Com isso podemos calcular a fluência ou dose, que é dada em J/cm^2 , também conhecida como densidade de energia, seguindo a equação abaixo:

(3.16)

$$D = \frac{P \cdot \Delta t}{A},$$

onde temos que P é a potência dada em W, Δt é o intervalo de tempo dado em s e A é a área dada em cm^2 [11].

A taxa de fluência (I), expressa em W/cm^2 , também conhecida como intensidade ou densidade de potência é dada por [5]:

(3.17)

$$I = \frac{P}{A}.$$

A equação (3.16) mostra a dose D sendo calculada em função da potência, porém, substituindo a equação (3.17) em (3.16) temos a dose em função da intensidade, assim:

(3.18)

$$D = I \cdot \Delta t$$

Diversos estudos têm sido realizados a fim de se estabelecer um modelo quantitativo para terapia fotodinâmica, que combina cálculos dosimétricos de luz baseados no método Monte Carlo com um grupo de equações para cálculo de taxas, com o intuito de entender o processo fotobiológico da TFD [102, 103].

A dose de luz é aplicada de modo regular e gradual afim de que se atinjam todos os pontos do volume desejado, de maneira que doses baixas ou altas podem não produzir os efeitos desejados. Além disso, o fato de se irradiar uma área menor ou maior também apresenta influência no processo. Assim, a Dose (J/cm^2) deve ser prescrita para áreas que desencadeiam as reações desejáveis nos locais escolhidos. Para cada situação tratada será calculada uma potência, um tempo de aplicação e uma dose de luz, pois de acordo com a dose administrada outros efeitos podem ser desencadeados como efeitos fototérmicos, fotoablação e outros [26].

3.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFA) ou Inativação Fotodinâmica (IFD).

A TFD é utilizada na destruição de células induzida pela luz visível de comprimento de onda ressonante, em baixas doses, seguido da administração de uma substância

fotosensibilizadora de localizada. Porém, quando as células a serem mortas são microrganismos patogênicos o procedimento é denominado Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFA) (em inglês, *Antimicrobial Photodynamic Therapy* - aPDT) ou Inativação Fotodinâmica (IFD). A terapia fotodinâmica antimicrobiana se baseia no mesmo princípio de ativação que a terapia fotodinâmica [5, 12, 13].

A primeira demonstração de inativação fotodinâmica letal de células microbianas foi registrada por Raab (1900) e mostrou que baixas concentrações de *azul de metileno* não tem qualquer toxicidade na ausência de luz para *Paramecium caudatum*, mas poderia conduzir à morte do microrganismo por exposição à luz do dia. Além disso, Raab mostrou que acridina e luz também eram tóxicas para o *Paramecium* [57, 58]. Embora o conceito de morte fotodinâmica antimicrobiana tenha sido conhecido desde o momento da descoberta de Raab, o advento da era do antibiótico impediu naquela época que o grande potencial que a terapia fotodinâmica tinha para o tratamento de infecções microbianas fosse desenvolvido e realizado [59].

Em um recente relatório publicado pela Organização Mundial de Saúde (em inglês, *World Health Organisation* - WHO) a gravidade do problema da resistência microbiana aos antibióticos foi afirmada e agora representa uma ameaça grave para a prevenção e tratamento de infecções causadas por bactérias, fungos, parasitas e vírus. Esta foi a primeira vez que uma pesquisa abrangente foi realizada para encontrar o status atual da resistência antimicrobiana em todo o mundo com base em dados de vigilância sanitária apresentados pelos 114 países. Dentre os diversos microrganismos que foram relatados, os resultados mostram as elevadas taxas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (em inglês, *methicillin*), especialmente em países subdesenvolvidos como, por exemplo, o Brasil (figura 12) onde geralmente, essa contaminação bacteriana se dá através de animais produtores de alimentos e da cadeia alimentar [25, 85].

Com tantos estudos mostrando a resistência microbiana, tem-se a necessidade de aprofundarem-se os estudos do uso da IFD contra doenças infecciosas, inativação de microrganismos e descontaminação de alimentos que agora é reconhecida como uma importante área de pesquisa acadêmica altamente emergente e já tem sido reconhecida como uma nova forma de tratamento de agentes infecciosos como mostrado em diversos artigos científicos [8, 9, 22, 23, 72-80].

Figura 12: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

Countries, territories and other areas or groupings	Data source ^{b, c, d}	Resistance (%)	No. tested isolates	Type of surveillance, population or samples ^c	Period for data collection	Year of publication or report
Brazil	National data, incomplete		5		2010	2013
Brazil	Publication (168)	16	388	Carriers (health care staff)	2006–2008	2011
Brazil	Publication (169)	43.4	53	Blood isolates (dialysis patients)		2010
Brazil	Publication (170)	2.4	102	Carriers (students)	2007	2010
Brazil	Publication (171)	44.5 (CF patients); 35 (non-CF-patients)	164 (CF patients); 200 non-CF patients	Cystic fibrosis (CF) patients and "non-CF" patients		2010
Brazil	Publication (172)	5.8	52	Carriers (health care staff)	2007	2008
Brazil	Publication (173)	31	2218	Consecutive laboratory isolates	2005–2008	2009
Brazil	Publication (174)	41.5	105	Maternity hospital	2002–2003	2009

a. cef, cefoxitin; oxa, oxacilin. Data on cefoxitin used when not specified.
b. National data refers to data returned on the questionnaires as defined in Annex 1. This definition does not imply that the data collected is representative for that country as a whole because information gaps are likely.
c. See Annex 1 for definitions.
d. "National data not available" means that there was information that no data were available; "No information obtained for this report" means that no information was obtained from authorities, networks or publications.

Fonte: Adaptado de WHO, 2014 [25].

As vantagens na utilização da IFD para o tratamento de doenças microbianas é o largo espectro de ação, uma vez que um fotossensibilizador pode agir em bactérias, fungos, leveduras e protozoários. A eficácia independe do padrão de resistência ao antibiótico da dada estirpe microbiana. Não há relatos de cepas fotossensíveis resistentes após vários tratamentos e também o fato do uso de fontes de luz de baixo custo para a ativação de agente fotossensibilizante contribui para o sucesso da técnica.

A inativação fotodinâmica (IFD) de microrganismos tem outras aplicações além do tratamento direto de infecções localizadas causadas por bactérias e descontaminação de alimentos. Tem havido um interesse na incorporação de fotossensibilizadores em revestimentos antimicrobianos de modo a reduzir a incidência de infecções adquiridas como um resultado das superfícies contaminadas em hospitais. Isso mostra as inúmeras utilidades da IFD em diversas áreas, com o objetivo de tentar trazer alternativas para tratamentos de contaminações [60, 81-84].

3.4 Mecanismos de Inativação de Células Microbianas

O mecanismo geral da terapia fotodinâmica tem funcionamento em duas etapas distintas. A primeira é dada pelos processos fotofísicos e fotoquímicos do FS e a sua capacidade para gerar agentes citotóxicos. A segunda é a resposta biológica da célula para os

agentes citotóxicos. A eficiência de um passo é determinada pela atividade de fotossensibilização, a qual o tempo de vida e o rendimento do estado tripleto do FS, tem um efeito sobre o rendimento quântico da formação molecular do oxigênio singleto. Os processos do tipo II são conhecidos na IFD como as principais vias de danos em células microbianas. O oxigênio singleto reage com as moléculas envolvidas na manutenção da estrutura da membrana celular tais como fosfolipídios e peptídeos. Os processos fotodinâmicos podem também danificar o DNA quebrando as bases de ligações por oxidação causando a morte celular [10].

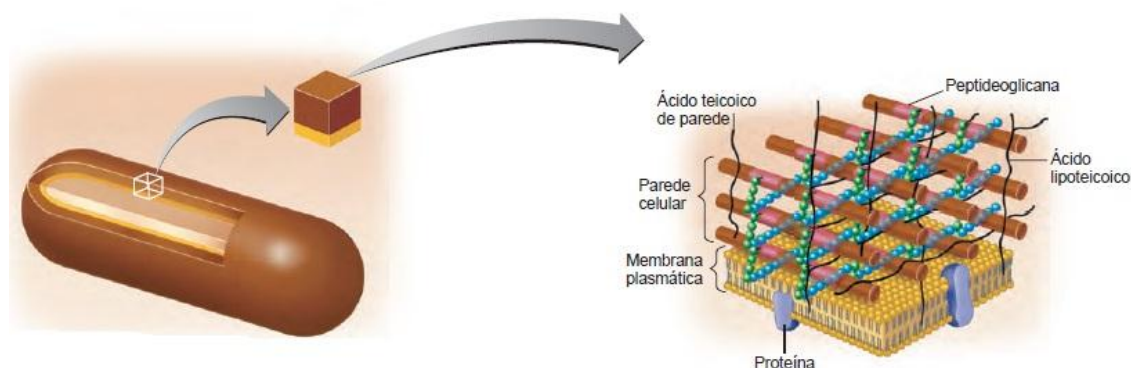
Contudo, ainda que os danos ao DNA ocorram, essa pode não ser a causa principal da morte celular bacteriana. Um exemplo é a bactéria *Deinococcus radiodurans*, que é conhecida por ter um mecanismo de reparação de DNA muito eficiente e é muito tolerante a UV ou radiação γ , e é facilmente inativada por IFD [9].

Existem diferenças estruturais entre as células de diferentes microrganismos. Esse é um fator importante que afeta o modo que o agente de fotossensibilização pode interagir com os alvos celulares e influenciam na eficácia da IFD. As bactérias são agrupadas em duas categorias principais de organismos: Gram-positivos e Gram-negativos (com base na sua estrutura celular e organização). As principais distinções entre esses dois grupos são as diferenças na sua estrutura da parede celular externa, como mostrado na figura 13. Esta diferença na estrutura influencia a permeabilidade da parede celular do microrganismo alvo para o FS, que é um fator importante que determina a atividade antimicrobiana dos processos fotodinâmicos. Embora a maioria dos fotossensibilizadores se mostrassem eficazes contra bactérias Gram-positivas, muitos exibiram baixa eficácia contra bactérias Gram-negativas devido à barreira adicional representada pela membrana externa carregada negativamente das espécies Gram-negativas [10, 61].

Para superar esta característica de resistência intrínseca de organismos Gram-negativos, diferentes estudos têm sido realizados com diferentes abordagens a fim de melhorar o funcionamento da IFD [61]. A partir destes estudos pode-se concluir que IFD pode ser eficaz na inativação de microrganismos em infecções, para a esterilização e como um desinfetante [74]. Também estes estudos mostram que a eficácia da IFD é dependente da concentração de FS, da dose de luz e das espécies microbianas.

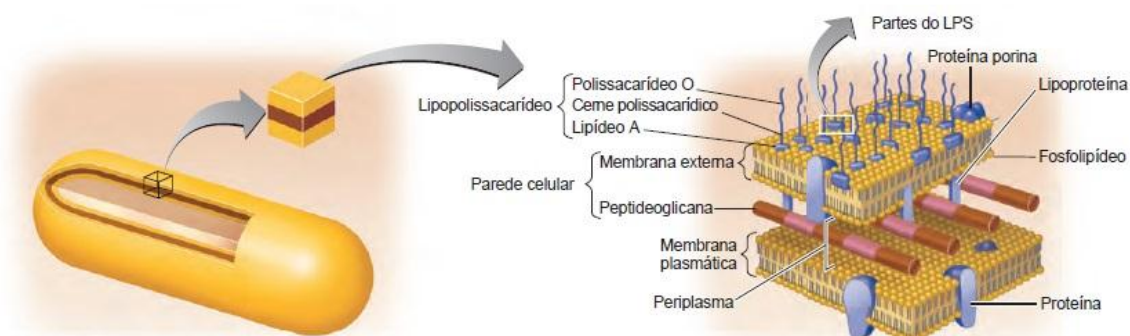
Figura 13: Diagramas ilustrando diferenças na estrutura da membrana entre as bactérias Gram-positivas (a) e Gram-negativas (b).

(a) Bactérias Gram-positivas



Fonte: Adaptado de Tortora, 2012 [62].

(b) Bactérias Gram-negativas



Fonte: Adaptado de Tortora, 2012 [62].

3.5 Iluminação Utilizada na IFD

A fonte de luz utilizada na IFD depende geralmente da profundidade de penetração da luz na área de atuação necessária no meio, utilizando-se assim, do aumento dessa penetração com a luz nas regiões do visível e do infravermelho próximo, e o comprimento de onda ótimo no qual a máxima produção de oxigênio singlete será obtida, a partir de um determinado fotossensibilizador. A fonte de luz pode ser coerente ou incoerente (laser, lâmpada específica ou LED) [63].

3.5.1 Luz Coerente

O *Laser* (do inglês, *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) é um exemplo de luz coerente por emissão estimulada de radiação (figura 14). Os *Lasers* produzem luz monocromática de alta energia. Isso permite a irradiação com o comprimento de onda exato em que um fotossensibilizador precisa para ter o seu máximo de absorção. Eles são cada vez mais usados como fonte de luz padrão para a maioria dos estudos de IFD e aplicações clínicas. Uma vantagem prática oferecida por uma IFD a *laser* é a facilidade de acoplamento de um feixe de *laser* em fibras, tornando-o ideal para a inserção em endoscópios flexíveis e para uso intersticial [33, 64].

Figura 14: *Laser* verde usado para aplicações da fotônica.



Fontes: <http://www.wired.co.uk/news/archive/2011-05/23/26-terabit-laser>.

Uma grande variedade de *lasers* tem sido usada ao longo dos anos. Estes *lasers* são descritos em termos do material gerador do feixe de luz (meio *laser*), o qual pode ser um gás, um corante, um cristal ou um diodo semiconductor [65]. Para estudos da IFD os *lasers* mais utilizados são o *laser* de hélio-neônio (He-Ne) e o *laser* semiconductor (*laser* de diodo). Estes têm a vantagem de serem de baixo custo e compacto. O uso do He-Ne tem sido bem documentado em IFD, em particular na inativação do *S. aureus* e *P. aeruginosa* [66].

Na atualidade podem ser encontradas comercialmente basicamente duas categorias de *lasers*: *laser* de alta intensidade de energia e *laser* terapêutico ou de baixa intensidade. O de alta intensidade é muito utilizado em terapias mais invasivas, como por exemplo, procedimentos cirúrgicos, ocasionando destruição na célula pelo efeito fototérmico, desnaturando o conteúdo proteico celular, coagulando, vaporizando o conteúdo hídrico da célula e carbonizando o tecido. O *laser* de baixa intensidade é utilizado em terapias que não necessitam ou que não se deseja o efeito fototérmico [26, 26].

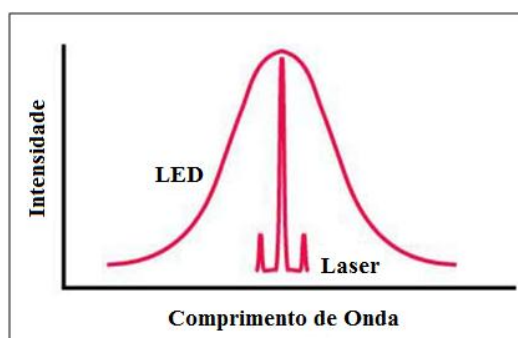
3.5.2 Luz Incoerente

Fontes de luz incoerentes incluem lâmpadas com espectro contínuo (lâmpadas incandescentes, lâmpadas de arco de xenônio) ou fontes com o espectro em faixas discretas (lâmpadas de descarga de gás ou lâmpadas de vapor metálico). A luz natural também é incoerente, policromática consistindo de diferentes comprimentos de onda e é divergente, tipicamente irradiando em todas as direções. A IFD comumente é aplicada utilizando fontes de luz incoerente, tais como diodos emissores de luz (LEDs) e lâmpadas de xenônio, pois, essas fontes de luz são fáceis de utilizar e relativamente baratas [65-67].

A luz incoerente tem várias vantagens como uma fonte de luz para a IFD: a natureza policromática da luz significa que diferentes FSs com diferentes bandas de absorção podem ser utilizados, e grandes campos de iluminação podem ser conseguidos. O que é particularmente relevante para indicações na inativação de microrganismos no tecido ou em alimentos. No entanto também há desvantagens na utilização destas luzes, pois, são de baixa intensidade nos comprimentos de ondas necessários, apresentam dificuldades de gestão da dose de luz e os efeitos térmicos são diversas vezes significativos. A baixa intensidade de luz incoerente significa que tempos de exposição longos são geralmente necessários para um efeito terapêutico ser alcançado. No entanto, as lâmpadas incandescentes e LEDs provaram serem úteis na IFD, especialmente para o *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* [65, 68].

Fazendo uma comparação em termos de largura do espectro de emissão, os *lasers* possuem um espectro mais estreito com relação às outras fontes de luz, o que faz com que seu feixe seja considerado monocromático. O que difere dos LEDs de cores definidas, pois, possuem um espectro de emissão mais amplo, emitindo luz em uma faixa de comprimentos de onda (figura 15) por meio da movimentação de elétrons através de diferentes materiais semicondutores, produzindo uma emissão espontânea de fótons não coerentes [69, 71].

Figura 15: Comparação entre espectros de emissão de um *laser* e de um LED.



Fontes: <http://www.thefoa.org/tech/ref/appln/transceiver.html>.

Então a luz LED se mostra uma boa alternativa na inativação de microrganismos em alimentos, pois, além de ser de baixo custo financeiro ainda conseguem iluminar grandes áreas [23].

3.6 Fotossensibilizador (FS)

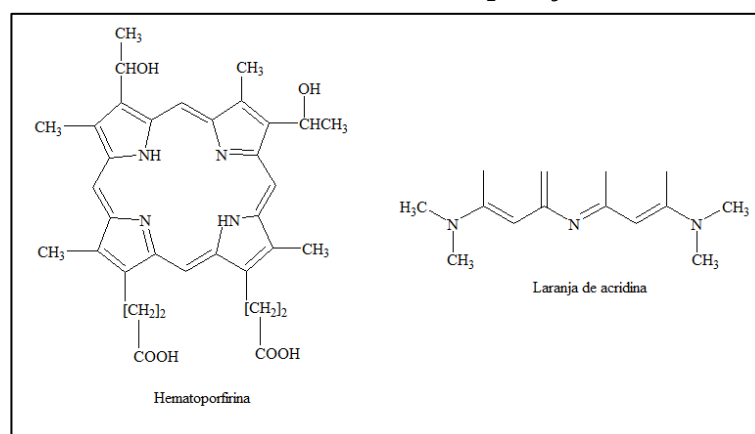
Historicamente os primeiros FSs utilizados para a ação terapêutica, foram desenvolvidos em três famílias definidas com base nas estruturas químicas dessas moléculas: as porfirinas, as clorinas e os corantes. Comumente essas categorias são divididas em gerações: primeira, segunda e terceira geração. A primeira geração de FSs é representada pelos derivados de hematoporfirina (HpD). Os medicamentos HpD disponíveis no mercado são Photofrin®, Photosan® e Photogem®. Para estudos científicos o Photofrin® foi o primeiro fármaco aprovado para ser utilizado na TFD. Trata-se de uma mistura complexa de monômeros, dímeros e oligômeros de um derivado da Hematoporfirina (HpD) [102]. Com o passar do tempo encontrou-se desvantagens na utilização da primeira geração de FSs, sentindo-se a necessidade de uma segunda geração que foram representadas pelos derivados das porfirinas modificadas, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas e naftalocianinas. Com isto, surge a chamada terceira geração com o objetivo de melhorar a seletividade dos FSs já desenvolvidos até aquele momento, fazendo com que fossem direcionados de maneira específica para o tecido lesionado por células cancerosas, incluindo assim, os compostos da primeira e segunda geração conjugados com alguns veículos biológicos, como anticorpos, nanopartículas, proteínas e peptídeos [5, 9, 102].

Os fotossensibilizadores geralmente são moléculas aromáticas com composição química natural ou sintética que tem a capacidade de absorver um fóton de luz na região do espectro visível (400 a 700 nm), em seguida, transfere a maior parte da energia absorvida para o oxigênio molecular nas proximidades, induzindo a uma série de reações fotoquímicas para produzir agentes tóxicos letais, EROs. As propriedades físico-químicas do FS são importantes para a eficácia da TFD ou IFD [97]. A captação subcelular do FS depende da sua estrutura química e natureza física, e também da forma como ele é administrado. Acredita-se que a Hematoporfirina foi o primeiro fotossensibilizador moderno a ser descoberto em laboratório, tendo seu isolamento sido realizado pela primeira vez em 1841. No entanto, suas propriedades como um fotossensibilizador não foram descobertas até 1911 [63].

Existem diferentes tipos de FSs e cada um desses tem como alvo diferentes compartimentos celulares, incluindo as mitocôndrias, lisossomos, retículo endoplasmático,

complexo de Golgi, matriz citoplasmática e a membrana plasmática, ou combinações destes compartimentos [98]. O motivo é que embora o princípio fotoquímico seja o mesmo para a aplicação em tratamentos de cânceres e na inativação de microrganismos, existem diferenças nas estruturas dos FSs e alvos celulares. A maioria dos FSs usados na TFD possuem núcleos tetrapirrólicos (formado por quatro anéis pirrólicos que vem do pirrol um composto aromático) como as porfirinas que são caracterizadas pela baixa toxicidade. Já os usados na IFD incluem também outros grupos como as acridinas, que são apresentados com suas estruturas químicas na figura 16 [5, 58].

Figura 16: Estrutura de dois fotossensibilizadores com aplicação em TFD.



Fonte: Adaptado de BAGNATO, 2008 [5].

Para que um composto seja considerado um fotossensibilizador, deve cumprir determinadas características para garantir a eficiência no processo fotodinâmico podendo ele ser no tratamento de enfermidades ou na eliminação de microrganismos. Então as propriedades ideais para a utilização de um fotossensibilizador nesse regime são [10, 99-101]:

- Um largo espectro de atividade que seja independente da resistência a antibióticos.
- Quimicamente puro e solúvel em água sendo estável em solução com um pH fisiológico, para facilidade de aplicação e ser rapidamente eliminado do corpo.
- Sensibilidade mínima da pele.
- Alto rendimento para a geração do estado tripleto de longa duração e do oxigênio singleto citotóxico são dois recursos importantes, que influenciam a eficiência do FS.
- Alta absorção de luz em comprimentos de onda mais longos (600-950 nm) é importante; eles devem, idealmente, absorverem a luz no comprimento de onda do vermelho (630 nm), que tem uma maior penetração nos tecidos do que os comprimentos de onda mais curtos. Portanto FSs que absorvem na região de 600-800nm são os preferidos.

- Captação seletiva pelos agentes patogênicos alvos.
- A posse de um amplo espectro de ação contra bactérias, fungos, leveduras, vírus, protozoários, parasitas e especialmente os que são resistentes aos antibióticos convencionais.
- Não específico em termos de segmentação biomolecular.
- Fotoestável durante a aplicação.

Com isso é visto que não há um FS perfeito, porém encontrar um agente que agregue o maior número de características expostas acima, para uma aplicação fotodinâmica, acaba se tornando um desafio para pesquisadores do mundo inteiro.

3.6.1 Sal de Curcumina

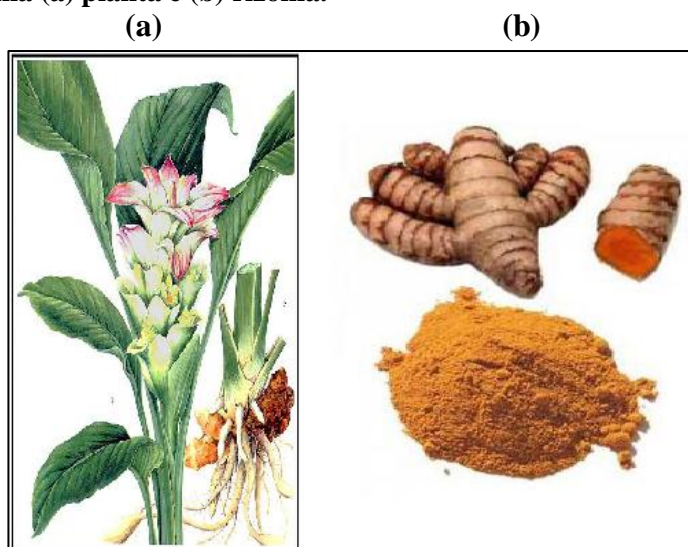
Com a resistência de microrganismos a diversos antibióticos, buscam-se novas alternativas de tratamentos para esses tipos de patógenos. Uma terapia alternativa que se destaca nesse âmbito é a IFD, porém como já discutido anteriormente para que se tenham resultados satisfatórios, essa terapia necessita de um FS eficaz para sua ativação. Tendo em vista esses aspectos, a busca por novos FSs mais ativos e naturais são comprovadas e necessárias. Os primeiros relatos de que plantas adquiriram fundamental importância em processos de cura, foi na China 3000 a.C. Com isso novas descobertas mostraram a importância de ervas na saúde, na culinária e no preparo de produtos diversos que contribuíram para a abertura de novas e amplas perspectivas na medicina natural.

Um FS natural que está sendo usado para a terapia fotodinâmica é a Cúrcuma, também conhecida como açafrão, açafrão da terra, gengibre dourado emangarataia, é uma planta de nome científico, *Curcuma longa* L., pertencente à família Zingiberaceae. Trata-se de uma planta perene (figura 17, a), nativa do sul e sudoeste asiático e extensivamente cultivado na Índia, principalmente em Madras, Bengal e Bombay, e também na China, Taiwan, Japão, Indonésia e no continente Africano. A *Curcuma longa* L. possui diversos princípios ativos, como óleo essencial, resinas, curcumina, turmerona, açúcares, amidos e saponinas, que atualmente enquadram o açafrão no quadro de plantas úteis medicinais [105, 106].

A parte que é utilizada da Cúrcuma é o rizoma (figura 17, b), extensão do caule que une sucessivos brotos, sendo ele piriforme (em formato de pera), arredondado ou ovoide carnudo com ramificações laterais compridas dando origem à chamada “Cúrcuma redonda”,

apresenta um odor agradável, levemente amargo, que lembra o gengibre, possuindo a cor amarelada por fora e alaranjada por dentro [105].

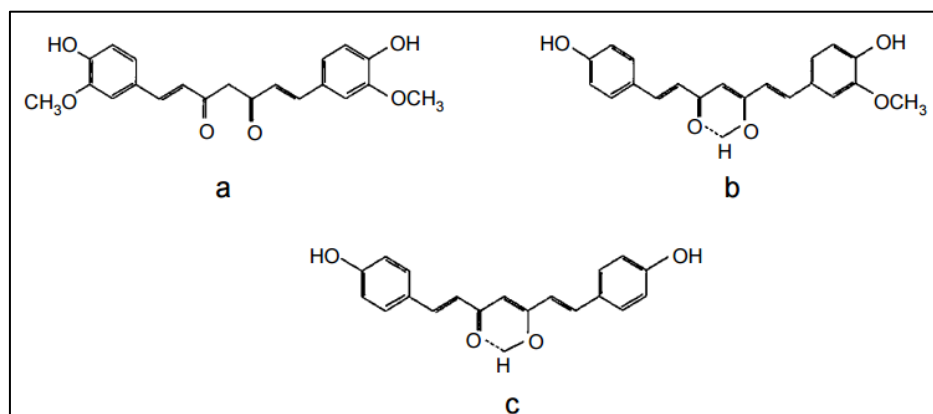
Figura 17: A Cúrcuma (a) planta e (b) rizoma.



Fonte: (a) <http://www.plantasquecuram.com.br/ervas/curcuma.html#.VqevmZorK01>. (b) http://www.bibliotecapleyades.net/ciencia/ciencia_industryhealthiermedica187.htm.

Os teores dos pigmentos encontrados no rizoma da cúrcuma são constituídos por três curcuminóides com suas composições químicas: a curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$), a demetoxicurcumina ($C_{20}H_{18}O_6$) e a bisdemetoxicurcumina ($C_{19}H_{16}O_4$) representados na figura 18 [106-108]. A curcumina tem peso molecular de 368,38 g/mol [128] é um dos pigmentos dos curcuminóides da planta sendo o mais utilizado e amplamente pesquisado por ter sido mostrado em vários estudos como um potencial agente antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório e principalmente, por sua ação anticarcinogênica [18, 23, 126, 127]. Trata-se de um composto polifenólico encontrado na concentração de 2,8 a 8%, obtido a partir do rizoma da *Curcuma longa* L. e tem como principal característica organoléptica a coloração avermelhada [106].

Figura 18: Estrutura química dos compostos biologicamente ativos a partir do açafrão: (a) Curcumina, (b) Demetoxicurcumina e (c) Bisdemetoxicurcumina.



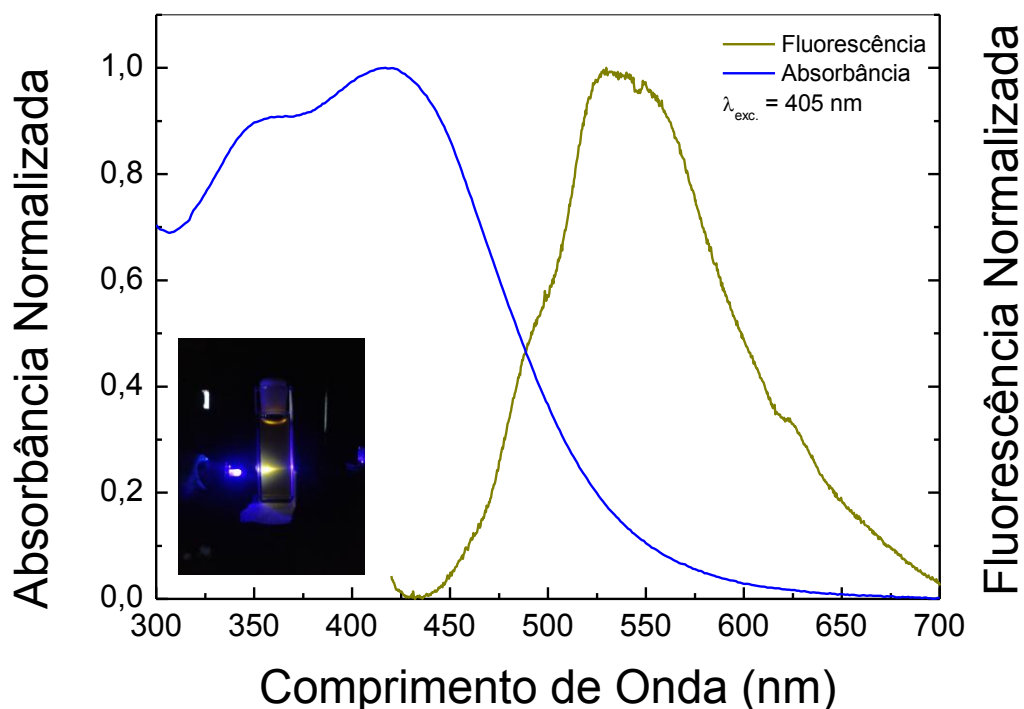
Fonte: Adaptado de SASIKUMAR, 2005 [109].

Além da sua propriedade como corante, a curcumina possui relevante interesse devido a seus efeitos benéficos no organismo humano. Existem diversos relatos da ação em doenças biliares, doenças hepáticas (auxiliando a redução dos níveis de colesterol) e feridas diabéticas (melhora a cicatrização). Também já foram relatadas as ações antiangiogênicas, capacidade de reduzir o colesterol sanguíneo, apresenta efeitos antitumorais e antiproliferativos contra vários tipos de tumores, tem propriedades anti-inflamatórias além de tratamento de câncer e inativação de bactérias [16, 18, 127].

No decorrer dos tempos foi mostrado à capacidade de inativação de microrganismos (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus epidermidis*) utilizando a curcumina como FS na IFD [19-21]. Estes microrganismos são a causa de várias doenças que vão da mais simples como a acne até as mais complexas como a meningite, pneumonia, intoxicação alimentar entre outras, podendo levar o indivíduo a óbito se não forem tratadas adequadamente [22-24].

Para este trabalho foi usado o sal de curcumina (sintetizado pela PDT Pharma de Cravinhos - SP) numa formulação especial da curcumina para tornar-se solúvel em água, porém mantendo todas as suas propriedades. A figura 19 mostra os espectros de absorção e emissão (no detalhe cubeta com o FS) do sal de curcumina, onde podemos observar a banda de absorção em aproximadamente 420 nm e a fluorescência na região do verde (~550 nm).

Figura 19: Espectros de absorção e emissão do sal de curcumina. No detalhe foto mostrando excitação em 405 nm e fluorescência.



Fonte: Autor, 2015.

A escolha do sal de curcumina como FS para este trabalho foi baseada em estudos que demonstram a eficácia antimicrobiana e demais efeitos citados acima, porém, principalmente por ser solúvel em água e se tratar de um composto natural, já utilizado como corante e tempero, considerado atóxico.

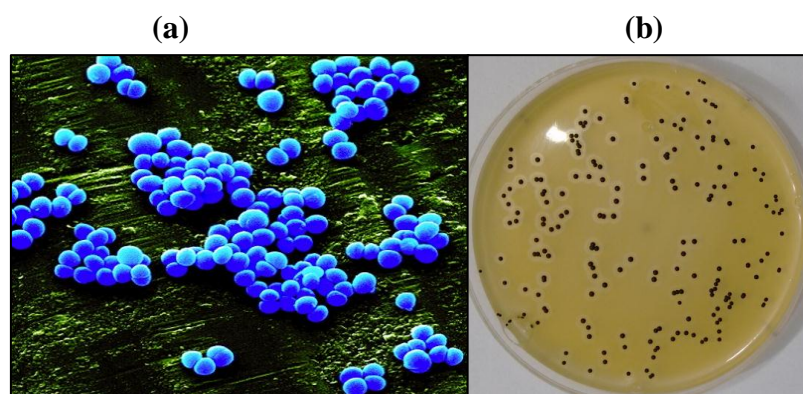
3.7 *Staphylococcus aureus*

Os *Staphylococcus* são bactérias esféricas Gram-positivas que habitualmente se dispõem em cachos irregulares devido à sua divisão celular, que ocorre em três planos perpendiculares (*Staphylococcus* vem do grego *Staphyle* e significa “cachos de uva”) (figura 20) [110] e são encontrados com frequência no corpo humano e em alimentos. Esses agentes patogênicos se destacam por serem grandes causadores de inúmeras síndromes. Atualmente existem 19 espécies que fazem parte deste gênero, dentre estas algumas se destacam por apresentarem interesse potencial em microbiologia de alimentos: *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. chromogens* e *S. intermedius*, sendo o *S. aureus* o mais importante [111]. A espécie de *S.*

aureus é a que está mais frequentemente associada às doenças estafilocócicas, quer sejam de origem alimentar ou não.

O *Staphylococcus aureus* pode causar uma variedade de infecções, mais notavelmente na pele, tecidos moles, ossos e infecções na corrente sanguínea. Isto é também a causa mais comum de infecções de feridas pós-operatórias. Algumas cepas de *S. aureus* produzem factores tóxicos que podem causar uma variedade de sintomas específicos, incluindo a síndrome do choque tóxico e intoxicação alimentar [25].

Figura 20: (a) *Staphylococcus aureus* visualizado no microscópio eletrônico e (b) colônias de *Staphylococcus aureus* no meio Ágar Baird Parker.



Fontes: (a) <http://textbookofbacteriology.net/MRSA.html>; (b) Autor, 2015.

De acordo com Jay [112] o *S. aureus* é classificado como microrganismo mesófilo¹, porém pode apresentar crescimento em temperaturas compreendidas entre 7°C e 47,8°C. Seu pH cresce na faixa de 4 a 9,8, sendo ótimo entre 6 e 7 [111]. Por outro lado, as enterotoxinas² estafilocócicas são produzidas entre 10°C e 46°C e apresentam elevada resistência térmica, podendo sobreviver aos tratamentos térmicos comumente aplicados ao leite, como a pasteurização e esterilização [113]. Acredita-se serem necessárias entre 10⁵ e 10⁶ UFC (unidades formadoras de colônias) de *S. aureus* por grama de alimento para que a toxina seja formada em níveis capazes de provocar intoxicação.

A contaminação de um alimento por este microrganismo pode ocorrer de diversas maneiras a mais comum é através do contato direto com o ser humano, pois, segundo Gorwitz [114] uma propriedade biológica fundamental do *S. aureus* é a sua capacidade de colonizar assintomaticamente indivíduos saudáveis, por exemplo, cerca de 30% dos seres humanos são

¹ Um organismo é mesófilo quando tem uma temperatura ótima de crescimento compreendida entre 20°C e 45°C.

² São toxinas produzidas por diversos microrganismos que nos seres humanos é uma das causas de intoxicação alimentar.

hospedeiro-nasais assintomáticos do *S. aureus*. Essa bactéria possui como característica somente uma membrana plasmática e uma parede celular espessa, formada basicamente por uma macromolécula porosa e insolúvel conhecida como peptidoglicano, e por ácidos teicóicos [62, 115, 116].

Mesmo esse microrganismo sendo encontrado na microbiota normal, como por exemplo, na cavidade bucal em 95% da população mundial e nas narinas e intestino de 30-50% de indivíduos saudáveis, o *Staphylococcus aureus* é o agente responsável por inúmeras infecções que acometem os seres humanos. Os estafilococos possuem uma ampla distribuição no meio ambiente e são considerados parasitas humanos. Eles também podem ser encontrados em outros animais e objetos inanimados [110].

3.8 Leite Cru e Pasteurizado

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de leite bovino, atrás dos Estados Unidos, Índia e China [117]. O leite é um fluido constituído por diversos nutrientes que são sintetizados na glândula mamária, a partir de precursores que são derivados da alimentação e também do metabolismo. Dentre os diversos componentes se destacam a água, glicídios (basicamente lactose), gordura, proteína (principalmente caseína e albumina), minerais e vitaminas. O leite é uma grande mistura de todos esses componentes e suas propriedades são mais complexas que a soma das diversas propriedades dos componentes individuais. A proporção de cada componente no leite está influenciada, em diferentes graus, pela nutrição da vaca. Assim, a alimentação responde por aproximadamente 50% das variações de gordura e proteínas do leite, porém praticamente não afeta o conteúdo de lactose [17].

Desde o princípio da civilização humana, o leite tem sido considerado um alimento básico para crianças e um complemento na dieta dos adultos [118]. Os elementos nutricionais, sobretudo proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais contidos no leite, transformam-no em um excelente substrato para o crescimento de microrganismos. A formação do leite demanda um enorme trabalho metabólico. Por exemplo, em uma vaca leiteira é requerida a passagem (fluxo) de 450 litros de sangue pela glândula mamária para produzir 1 litro de leite. Essa quantidade de leite produzida varia muito em função da espécie e da raça, além da variação individual [119].

A qualidade do leite, como por exemplo, do cru, é diretamente influenciada por múltiplas condições, entre as quais se destacam os fatores zootécnicos e aqueles relacionados

à obtenção do produto que dependendo de como é realizada a coleta desse leite pode afetar a qualidade microbiológica do produto, determinando, inclusive, o prazo de sua vida útil.

O leite em média, está formado por 7/8 de água e 1/8 de substâncias sólidas, o que se denomina Extrato Seco Total e representa a parte nutritiva do leite (tabela 3) [120].

Tabela 3: Substâncias constituintes do leite.

Água	87%
Extrato Total Seco	
Gordura	4,0%
Extrato Seco Desengordurado	
Lactose	4,8%
Proteínas	3,5%
Sais Minerais	0,7%

Fonte: Adaptado de TRONCO, 1996 [120].

A proteína do leite, a caseína, é particularmente adequada ao organismo para a elaboração e reparo do tecido muscular. O seu coeficiente de digestibilidade é de 97%. O açúcar do leite está sob a forma de lactose que não é tão doce quanto o açúcar da cana. A lactose não fermenta rapidamente e por isso não provoca alterações digestivas como acontece com outros tipos de açúcares. A digestibilidade é de 98% [121].

O leite bovino pode ser pasteurizado que é um método de tratamento que equaliza tempo e temperatura, visando melhorar as suas condições microbiológicas aumentando a vida útil desse leite tentando preservar ao máximo seus aspectos nutricionais. Conforme o **Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo C** do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, no uso da atribuição que lhe confere o art. 87, Parágrafo único, inciso II, Item 2.1.4 da Constituição, entende-se por Leite Pasteurizado tipo C o produto definido neste Regulamento Técnico, classificado quanto ao teor de gordura como integral, padronizado a 3% m/m (três por cento massa por massa), semidesnatado ou desnatado, submetido à temperatura de 72 a 75 °C (setenta e dois a setenta e cinco graus Celsius) durante 15 a 20s (quinze a vinte segundos), exclusivamente em equipamento de pasteurização a placas, dotado de painel de controle com termo-registrador computadorizado ou de disco e termo regulador automático, válvula automática de desvio de fluxo, termômetros e torneiras de provas, seguindo-se resfriamento imediato em equipamentos a placas até temperatura igual ou inferior a 4 °C (quatro graus Celsius) e ênfase no menor

prazo possível, sob as condições que minimizem contaminações [122]. A pasteurização apresenta vantagens e desvantagens, porém, as vantagens viabilizam o processamento (tabela 4).

Tabela 4: Principais vantagens e desvantagens da pasteurização.

Principais Vantagens da Pasteurização	Desvantagens
Evita transmissão de doenças.	Reduz/elimina bactérias lácticas benéficas (fermentos naturais).
Reduz a carga bacteriana do leite.	
Elimina bactérias indesejáveis.	Desnaturação das proteínas do leite dificulta certos processos (ex: queijo).
Prolonga a vida de prateleira do leite e derivados.	
Beneficia a tecnologia e qualidade dos laticínios.	Altera sabor do leite.

Fonte: BEHMER, 1987 [123].

Contudo, Behmer [123], afirma que a pasteurização não renova um leite de qualidade ruim ou alterado, é apenas um recurso de natureza industrial, para prevenir e retardar sua deterioração. Como o leite é um dos meios mais ricos em nutrientes ele acaba atraindo diversos microrganismos que tem seu crescimento favorável nesse meio, como mostra a tabela 5 com os principais microrganismos contaminadores de alimentos [124].

Tabela 5: Principais microrganismos encontrados em alimentos.

Nome do Microrganismo	Principais Alimentos Envolvidos
<i>Campylobacter jejuni</i>	Carne de aves, ovos, carne bovina, moluscos crus, mexilhões, ostras e leite cru .
<i>Escherichia coli</i>	Hambúrguer, leite cru e cidra de maçã.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Queijos, produtos cárneos, pescado e vegetais.
<i>Salmonella sp</i>	Leite cru , produtos de laticínios, carne de aves, suínos, bovinos, vegetais e pescado, ovos, água e moluscos.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pescado, leite cru , produtos de laticínios, principalmente queijos, produtos cárneos,

	massas, produtos de confeitaria, preparações à base de frango, ovos e outros, especialmente muito manipulados.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Leite cru , achocolatado, sorvetes, vegetais, carne de suínos e seus derivados e pescado.

Fonte: Adaptado de HOFFMANN, 2001 [125].

A tabela mostra que dos seis microrganismos *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp*, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica* o único que é mais improvável de ser encontrado em uma contaminação no leite é a *Listeria monocytogenes*, comprovando assim a vulnerabilidade desse alimento perante todos esses microrganismos. É sabido que do ponto de vista da saúde pública, esse leite ocupa um lugar de destaque na nutrição humana [125], daí a importância de se trabalhar para encontrar uma maneira de eliminar os microrganismos desse leite, que não são benéficos para o ser humano, mas que durante esse processo não agrida suas propriedades.

Foram apresentados neste capítulo os princípios e funcionamento das ferramentas necessárias para a aplicação da TFD e IFD em um meio biológico, a seguir serão apresentados os materiais e métodos utilizados para a aplicação neste trabalho, onde será realizada a IFD no *Staphylococcus aureus* contido no leite cru e leite pasteurizado tipo C.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

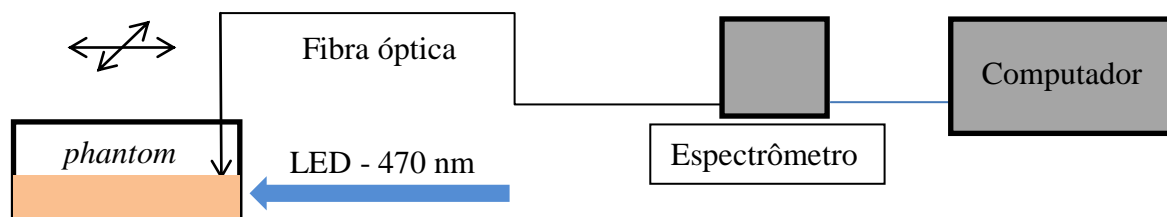
Neste capítulo são mostrados os procedimentos realizados para as medidas de penetração e espalhamento da radiação em *phantoms* e para a aplicação da Inativação Fotodinâmica (IFD) do microrganismo *Staphylococcus aureus* inoculado em amostras de leite cru e leite pasteurizado, tendo como fotossensibilizador o sal de curcumina. Foram testadas situações experimentais com o objetivo de encontrar condições ótimas que melhor inviabilizassem o crescimento deste microrganismo.

O experimento foi realizado em parceria com o Laboratório de Controle e Qualidade de Alimentos (LCQA), sob a supervisão da Prof.^a Dra. Maria Cristina Delgado da Silva da Faculdade de Nutrição (FANUT) e o Laboratório de Fotônica e Fluidos Complexos (LFFC) sob a orientação da Prof.^a Dra. Maria Tereza de Araujo do Instituto de Física (IF), sendo os dois laboratórios da Universidade Federal de Alagoas.

4.1 Medidas de Penetração e Espalhamento da Radiação em *Phantoms*.

Com o intuito de entender o comportamento da inativação do *S. aureus* como função da penetração e espalhamento de luz em um meio turbido altamente espalhador, simulou-se esse meio com os componentes das soluções aquosas (*Phantom* → leite+água destilada estéril+FS), nos preocupando em variar a concentração de leite nas amostras. Foi utilizado o leite cru e o leite pasteurizado e para a diluição do meio a água destilada estéril e como fotossensibilizador foi usado o sal de curcumina. Incidimos luz em 470 nm (LED) em cubo de acrílico com o *phantom* específico e medimos a intensidade da luz em diversos pontos do meio com uma fibra óptica (R400-7-VIS-NIR-Ocean Optics-USA) (figura 21). As intensidades foram adquiridas por um espectrômetro (Ocean Optics-USB2000-USA) e os dados foram traçados como função da profundidade de penetração na direção de propagação da luz incidente, como também, perpendicularmente à propagação. No capítulo 5 apresentaremos um gráfico com o comportamento da intensidade da luz penetrando no meio para várias concentrações de leite. Mostraremos, também, as curvas de isointensidade, ou seja, um mapa dos pontos de mesma intensidade da luz registrados dentro do meio. Essas medidas tiveram participação direta do aluno de iniciação científica Walter Muniz Júnior.

Figura 21: Arranjo experimental para medidas de Penetração e Espalhamento de luz em *Phantoms* das soluções aquosas de leite.



Fonte: Autor, 2015.

Após esse procedimento realizamos também a inativação fotodinâmica para diferentes concentrações de leite cru e pasteurizado, para uma posterior comparação com as medidas de penetração e espalhamento de luz em *phantoms*.

Os resultados serão mostrados no capítulo 5, feito as devidas análises.

4.2 Aplicação da IFD no *S. aureus* seguindo a análise microbiológica

Para a realização da IFD seguimos o método de diluição de microrganismo em alimentos já conhecido na literatura [129]. Os materiais e métodos para aplicação são mostrados a seguir.

4.2.1 Meios de cultura

Para este trabalho foram utilizados dois meios de cultura o BHI (Brain Heart Infusion) (DIFCO - São Paulo – SP) e o BP (Ágar Baird Park) (Prodimol Biotecnologia - Belo Horizonte - MG). O meio de cultura caldo BHI foi preparado para a inoculação do microrganismo. Esse meio de cultura foi proporcionado, manipulado e esterilizado segundo as recomendações do fabricante. A principal função do meio BHI é proporcionar o crescimento de vários tipos de microrganismos, incluindo a espécie testada neste estudo. A água destilada estéril (ADE) foi preparada de forma simples, de posse de um frasco, colocava-se o nível de água pretendido e esterilizava-se em autoclave a temperatura de 121°C por 15 minutos. Os outros materiais necessários como tubos Falcon, béqueres e demais instrumentos de auxílio também foram esterilizados em autoclave a temperatura 121°C por 15 min.

O meio de cultura selecionado para a semeadura em placas de Petri foi o BP que é um meio específico para o cultivo da bactéria *Staphylococcus aureus*. Esse meio de cultura foi

proporcionado, manipulado e esterilizado segundo as recomendações do fabricante. Para o preparo do meio, foi utilizada uma proporção de 63 g de pó para 950 mL de água destilada. Em seguida, foi esterilizado a 121 °C por 15 min. A esse meio de cultura, ainda na fase líquida devidamente resfriado a 45 °C foi adicionado solução de telurito de potássio e a emulsão de gema de ovo e em seguida distribuído em placas de Petri estéreis. As placas foram mantidas em câmara de fluxo laminar até a solidificação do meio de cultura e depois incubadas em estufa bacteriológica a 36°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 24 horas para realizar prova de esterilidade. Após esse período as placas que apresentaram quaisquer indícios de crescimento microbiano, foram descartadas, garantindo assim, placas isentas de contaminação. Todos esses procedimentos foram realizados sempre, 24 horas antes da realização dos experimentos.

4.2.2 Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25922 (Laborclin - Paraná). Para a utilização desse microrganismo, foi necessário inicialmente a sua ativação através de procedimento padrão do laboratório de microbiologia, conforme recomendação do fabricante. Em seguida, semeou-se uma alçada (0,01 mL) da cepa ativada em 2 mL de caldo BHI e incubou-se em estufa à 36°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 24 horas.

4.2.3 Amostras de Leite Cru e Pasteurizado

Para a realização do experimento foi necessário à obtenção de amostras de leite cru e pasteurizado. A amostra de leite cru foi obtida diretamente de um laticínio localizado na cidade de Maceió/AL a qual era coletada em condições assépticas e transportada diretamente para o laboratório em isopor com gelo até o momento da análise. O período entre o transporte e a realização do experimento nunca ultrapassava de 2 horas. Já o leite pasteurizado tipo C foi obtido de estabelecimento comercial da cidade de Maceió/AL e encaminhado diretamente para o laboratório no dia do experimento. Esses dois tipos de leite foram utilizados no processo de IFD.

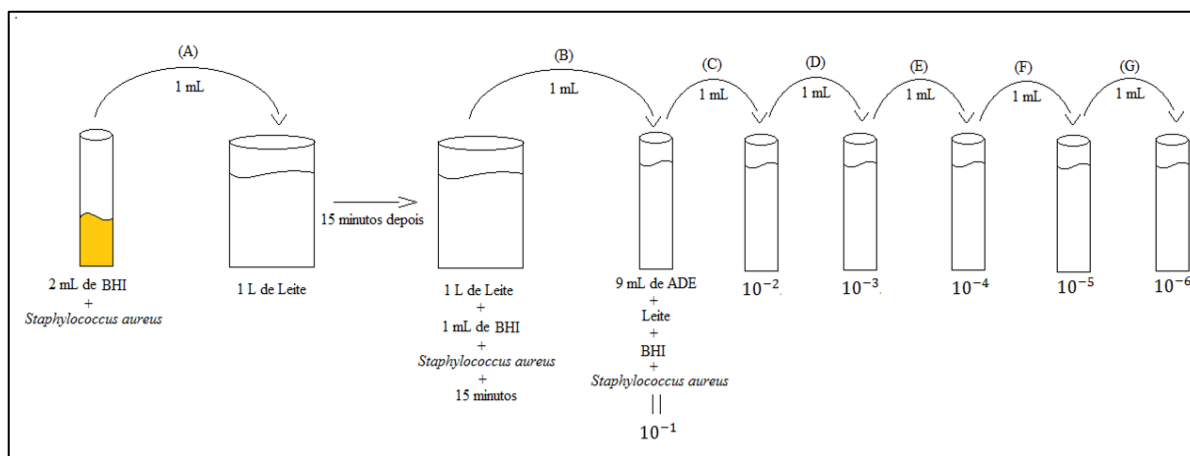
4.2.4 Teste de Diluição

O teste de diluição foi realizado com o intuito de observar qual diluição possibilitava uma melhor contagem do número de colônias de *Staphylococcus aureus* após a contaminação

do leite, pois é sabido que, geralmente, esse leite encontra-se com algum tipo de contaminação seja devido a procedimentos inadequados durante a ordenha ou a uma pasteurização ineficaz.

O teste foi realizado seguindo a técnica padrão de diluição em análises microbiológicas, da seguinte forma: após crescimento de *Staphylococcus aureus* em caldo BHI à temperatura de 36°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) por 24 horas, retirou-se 0,1 mL desse inóculo e adicionou-se em 1,0 L de leite (cru ou pasteurizado) (A). Em seguida homogeneizou-se por 1 minuto e deixou-se a amostra descansar por 15 minutos. A seguir, retirou-se 1,0 mL dessa amostra de leite contaminada e adicionou-se a um tubo contendo 9,0 mL de ADE (B) obtendo assim, a diluição de 10^{-1} . Agitou-se o tubo no vórtex (Type 16700 Mixer - 120 V - Modelo M16715 - USA) por 30 segundos e em seguida preparou-se as demais diluições até obter a 10^{-6} conforme apresentado no esquema da Figura 22 [129].

Figura 22: Esquema para obtenção das diluições



Fonte: Autor, 2015.

Posteriormente realizou-se a semeadura em superfície de placas de Petri contendo o meio de cultura sólido BP em triplicata. Semeou-se $100\ \mu\text{L}$ de cada diluição e espalhou todo o inóculo na superfície do meio (método *spread plate*) com o auxílio da alça Drigalski, conforme mostra a Figura 23. Após a semeadura as placas foram invertidas e incubadas em estufa a 36°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) por 24 horas. A seguir realizou-se a contagem das colônias típicas de *S. aureus* conforme recomendado [130]. Esse procedimento foi realizado tanto para o leite cru quanto para a amostra de leite pasteurizado.

Figura 23: Método de Semeadura com alça Drigalski.

Fonte: Autor, 2015.

Após a realização da contagem de colônias nas placas, escolheu-se a diluição que apresentou contagens entre 25 e 250 colônias de bactérias (diluição 10^{-3}) conforme recomendação da literatura [129], tanto para as amostras de leite cru como pasteurizado (Tabelas 6, 7).

Tabela 6: Número de colônias de bactérias por diluição para o leite cru.

Diluições	Placa 1	Placa 2	Placa 3
10^{-1}	Inc.	Inc.	Inc.
10^{-2}	Inc.	Inc.	Inc.
10^{-3}	185	173	164
10^{-4}	23	17	8
10^{-5}	0	0	0
10^{-6}	0	0	0

Inc. = incontável

Fonte: Autor, 2015.

Tabela 7: Número de colônias de bactérias por diluição para o leite pasteurizado.

Diluições	Placa 1	Placa 2	Placa 3
10^{-1}	Inc.	Inc.	Inc.
10^{-2}	Inc.	Inc.	Inc.
10^{-3}	221	210	199
10^{-4}	26	5	1
10^{-5}	2	1	0
10^{-6}	0	0	0

Inc. = incontável

Fonte: Autor, 2015.

4.2.5 Fotossensibilizador

O fotossensibilizador utilizado neste trabalho foi o sal de curcumina (peso molecular de 730,32 g/Mol), que é diferente da curcumina encontrada comercialmente por ser solúvel em água. O sal de curcumina é obtido através do extrato da *Curcuma Longa* Linn e produzido pela PDT Pharma (Cravinhos – SP – Brasil). Para a verificação de qual concentração e dose de luz seria utilizada no presente trabalho, foi realizado uma pesquisa prévia na literatura, além de um breve estudo piloto com o respectivo microrganismo. As concentrações do sal de curcumina escolhidas para a realização deste trabalho são apresentadas na Tabela 8. O tempo de incubação das concentrações do FS no escuro, solubilizados na amostra antes de ser irradiada, foi de 15 minutos.

Tabela 8: Concentrações do sal de curcumina utilizadas na inativação de *Staphylococcus aureus*.

Concentração do FS sal de curcumina (mg/L)
750
1500
3000

Fonte: Autor, 2015.

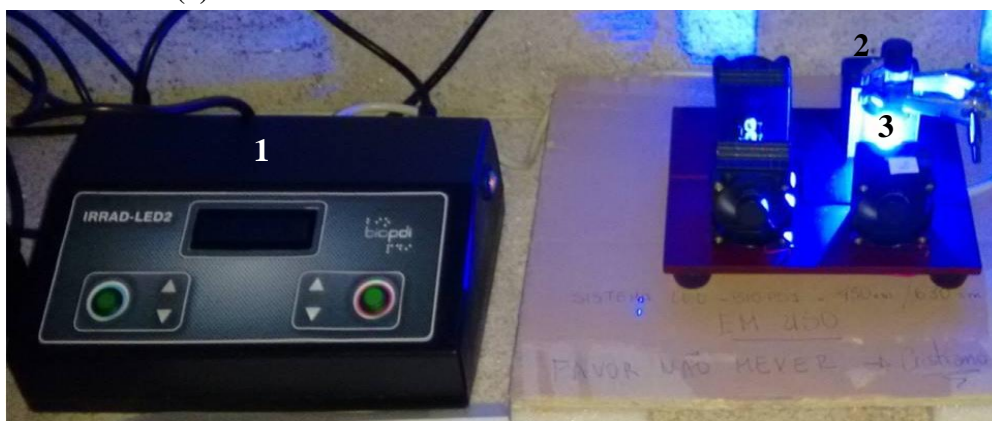
As amostras do FS foram pesadas no laboratório de Física, em ambiente protegido da luz e já eram colocadas nos tubos secos onde era realizado o experimento. Essas concentrações contendo as amostras eram envolvidas em papel alumínio para manter o fotossensibilizador sem exposição à luz até o momento da realização do experimento.

4.2.6 Iluminação e Dosimetria

Neste trabalho foram utilizados como fonte de luz, dois conjuntos de três LEDs emitindo no comprimento de onda de aproximadamente 450 nm (luz azul). Cada três LEDs foram dispostos em placas na vertical e as placas foram colocadas em paralelo com espaçamento entre elas para ser colocado o recipiente com a solução a ser irradiada. O sistema de LEDs (Biopdi - São Carlos - SP) (figura 24) tem visor que possibilita saber a corrente elétrica entregue aos LEDs e nos auxiliou montar uma curva de calibração para a leitura da potência de saída, usamos para isto um medidor de potência com área do sensor de 1,0 cm²

(Optical Power Meter 3664- HIOKI- Japan). A certeza no valor da potência de saída do equipamento é um fator importante a ser considerado, pois este valor, juntamente com o tempo de iluminação, determina a densidade de energia aplicada na amostra irradiada.

Figura 24: Sistema de LEDs irradiando em 450 nm: (1) Fonte de corrente alimentadora, (2) Placas com os LEDs e (3) Amostra irradiada.



Fonte: Autor, 2015.

As doses de luz ou fluência mostram as densidades de energia irradiadas e foram calculadas usando a equação (3.16). Para este trabalho, as doses usadas são mostradas na tabela 9, juntamente com as potências, tempos de exposição e a área, que era de 1,0 cm².

Tabela 9: Doses, potências, tempos de exposição de luz nas amostras e área iluminada.

Dose (J/cm ²)	Potência (mW)	Tempo (min)	Área (cm ²)
9	30	5	1,0
54		30	
18	60	5	
108		30	
33	110	5	
198		30	

Fonte: Autor, 2015.

4.2.7 Formação dos Grupos

Para a realização desta pesquisa foram formados 4 (quatro) grupos com a finalidade de avaliar a eficácia da IFD na inativação de *Staphylococcus aureus* presente nas amostras de leite cru e leite pasteurizado contaminadas. Os experimentos foram realizados em triplicata em ocasiões distintas. Foram utilizadas para a aplicação da IFD, 6 (seis) doses de luz com 3 (três)

potências diferentes em 2 (dois) tempos característicos e o fotossensibilizador em 3 (três) concentrações. Os grupos foram formados como mostrado na tabela 10, sendo as siglas descritas abaixo:

- G1 - CONTROLE (Leite + BHI + Bactéria + ADE).
- G2 - CURCUMINA (Leite + BHI + Bactéria + ADE + Sal de Curcumina).
- G3 - LUZ (Leite + BHI + Bactéria + ADE + Luz).
- G4 - IFD (Leite + BHI + Bactéria + ADE + Sal de Curcumina + Luz).

Tabela 10: Grupos experimentais segundo a concentração do fotossensibilizador, potência irradiada, tempo de exposição e dose de luz.

Grupo	Concentração do FS (mg/L)	Potência (mW)	Tempo (min)	Dose de Luz (J/cm ²)
G1	-	-	-	-
G2	750	-	15	-
	1500	-	15	-
	3000	-	15	-
G3	-	30	5	9
		60		18
		110		33
G3	-	30	30	54
		60		108
		110		198
G4	750	30	5	9
		60		18
		110		33
G4	1500	30	5	9
		60		18
		110		33
G4	3000	30	5	9
		60		18
		110		33
G4	750	30	30	54

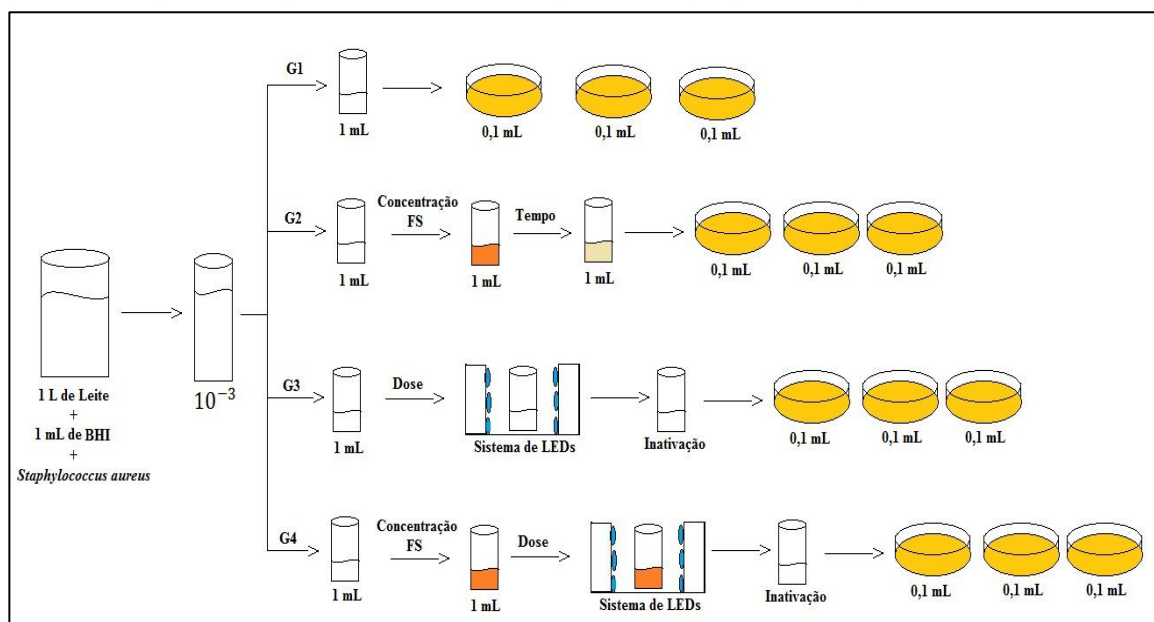
		60		108
		110		198
G4	1500	30	30	54
		60		108
		110		198
G4	3000	30	30	54
		60		108
		110		198

Fonte: Autor, 2016.

4.2.8 Aplicação da Inativação Fotodinâmica (IFD).

O processo de aplicação da IFD segue o esquema apresentado na figura 25. O processo foi submetido aos tratamentos descritos na tabela 10.

Figura 25: Esquema do procedimento de IFD para cada grupo investigado.



Fonte: Autor, 2015.

Para o grupo G1 pipetou-se 1,0 mL da diluição 10^{-3} e colocou-se em um tubo de ensaio que, após agitação em Vortex por 30s, semeou-se em placas de Petri contendo BP em triplicata (Figura 25). Para o grupo G2, realizou-se o mesmo procedimento do grupo G1, porém utilizando 2,0 mL da amostra distribuída em dois tubos de 1,0 mL, sendo um controle e o outro adicionado das concentrações do FS (750, 1500 ou 3000 mg/L) (Figura 25). Esse

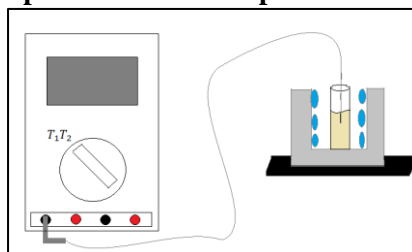
procedimento foi realizado para as 3 concentrações e os dois tempos (5 e 30 min). Já para o grupo G3 realizou-se o procedimento do grupo G1, porém tomando-se 4,0 mL da amostra e distribuindo em 4 tubos de 1,0mL, sendo um controle e os demais passaram a receber doses de luz de 9, 18 e 33 J/cm² (Figura 25). Posteriormente, repetiu-se o procedimento para o grupo G3, porém incidindo doses maiores de luz (54, 108 e 198 J/cm²) (Figura 25). Por fim, realizou-se o protocolo para o grupo G4 (grupo da IFD), iniciando com a concentração de 750 mg/L do FS, seguindo o procedimento do grupo G1. Logo em seguida pipetou-se 4,0 mL da amostra e distribuiu 1,0 mL em cada tubo de ensaio, sendo plaqueado um tubo como o controle e os demais se adicionavam o FS. A seguir, esperou o tempo (5 ou 30 minutos) adequado de sua dose (9, 18, 33, 54, 108 ou 198 J/cm²) para começar a ser irradiado. Esse período de pré-irradiação era realizado no escuro, para o FS não ter contato com nenhum tipo de luz (Figura 25).

Em todos os procedimentos descritos para os grupos G1, G2, G3 e G4, após o procedimento de semeadura, as placas de Petri eram acondicionadas em estufa a 36 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$) pelo período de 24 horas. Após incubação era realizada a contagem de UFC/mL (unidade formadoras de colônias por mL de amostra) para cada grupo testado.

4.2.9 Teste Térmico.

Os testes de aquecimento das amostras para os tempos de irradiação e potências utilizadas nesse trabalho foram realizados com o intuito de verificarmos a variação de temperatura sofrida pelo meio a ser inativado durante a IFD. Foi utilizado um Multímetro Digital Automático (*Optical RS 232 – BRIMEN*) (figura 26), no modo termômetro, com termopar para as medidas térmicas.

Figura 26: Esquema utilizado para o teste de temperatura com um multímetro digital.



Fonte: Autor, 2016.

A partir dos valores de aquecimento foi montada uma tabela com as medidas de temperatura realizadas a cada minuto durante a IFD de 5 e 30 minutos para as três potências

utilizadas. Essas quantidades são dadas em °C e foram realizadas três vezes, sendo depois encontrada a média das temperaturas.

Para calcular a variação da temperatura inicial (T_i) até a temperatura final (T_f) no tempo escolhido para este trabalho, foi utilizada a equação (4.1) mostrada a seguir:

$$\Delta T = T_f - T_i \quad (4.1)$$

4.2.10 Determinação do teor de proteína nas amostras de leite

A determinação do teor de proteína nas amostras de leite cru e de leite pasteurizado tipo C antes e depois da IFD foi realizada no Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Nutrição da UFAL. Foi utilizado o método de Kjeldahl que é o método oficial para a determinação da concentração de proteínas, a partir da concentração de nitrogênio total [131].

O procedimento iniciou-se transferindo 5,0 mL da amostra para um frasco de Kjeldahl de 300 mL. Em seguida adicionou-se 25,0 mL de ácido sulfúrico e 6,0 g da mistura catalítica. Foi levado para o aquecimento em chapa elétrica até a solução se tornar azul-esverdeada e livre de material não digerido (pontos pretos). Aqueceu-se por mais uma hora e depois deixou-se esfriar. A seguir transferiu-se quantitativamente o material do balão para o frasco de destilação, colocando 10 gotas do indicador fenolftaleína e 1,0 g de zinco em pó (para ajudar a clivagem das moléculas grandes de protídios). Depois se ligou imediatamente o balão ao conjunto de destilação e mergulhou-se a extremidade afilada do refrigerante em 25 mL de ácido sulfúrico a 0,05 M, contido em frasco Erlenmeyer de 500 mL com 3,0 gotas do indicador vermelho de metila. Adicionou-se então ao frasco que contém a amostra digerida, por meio de um funil com torneira, solução de hidróxido de sódio a 30% até garantir um ligeiro excesso de base. Foi aquecido novamente à ebulição e destilado até se obter cerca de (250-300) mL do destilado. Em seguida titulou-se o excesso de ácido sulfúrico 0,05 M com solução de hidróxido de sódio 0,1 M, usando vermelho de metila.

4.2.10.1 Cálculo

O cálculo foi realizado segundo a equação (4.2) [131], mostrada abaixo:

$$\frac{V \cdot 0,14 \cdot f}{P} = \text{protídios por cento } \frac{\text{m}}{\text{m}}, \quad (4.2)$$

onde V é a diferença entre o número de mL de ácido sulfúrico 0,05 M e o número de mL de hidróxido de sódio 0,1 M gastos na titulação, P o número de g da amostra e f o fator de conversão. O fator de conversão do leite e derivados é de 6,38, com isso foi calculado o quanto de proteína continha no leite cru e pasteurizado sendo o procedimento realizado em duplicata para cada análise de proteína antes e depois da IFD.

4.2.11 Análise Estatística

A avaliação estatística da eficácia da Inativação Fotodinâmica do *Staphylococcus aureus*, por meio das contagens de colônias (UFC/mL), foi efetuada por análise de variância (ANOVA). Os resultados que apresentaram diferença significativa $p < 0,05$ foram submetidos ao teste de comparação múltipla de TUKEY, pelo software Past. Assim todos os métodos mostrados neste capítulo foram realizados no experimento da Inativação Fotodinâmica do *Staphylococcus aureus*, com os resultados mostrados a seguir, feitos às devidas análises.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

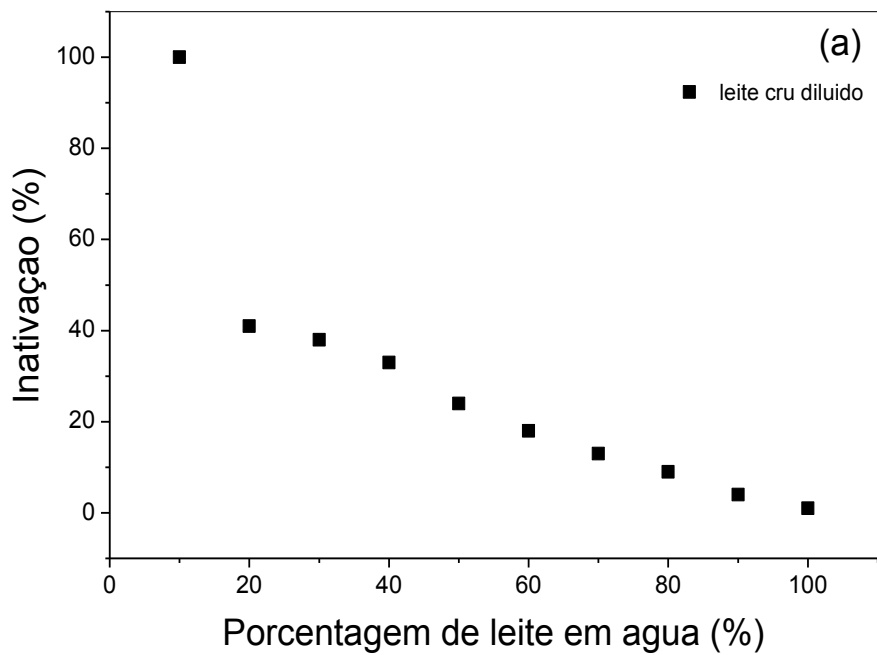
Realizaram-se as medidas de penetração da luz no leite puro e com diluições através da IFD e através das medidas de *phantoms*. Foi aplicada também a técnica de Inativação Fotodinâmica (IFD) usando LED em 450nm e sal de Curcumina como fotossensibilizador (FS) seguindo a análise microbiológica. Investigamos a inativação como função das concentrações do FS, das potências incidentes e dos tempos de irradiação das amostras. Fizemos a contagem das unidades formadoras de colônias para todos os quatro grupos experimentais e transformamos esses resultados para \log_{10} para uma melhor visualização da variância dos resultados e aplicamos as estatísticas ANOVA e TUKEY para a análise dos dados obtidos. Determinamos o teor de proteína dos leites antes e após a IFD para verificar se havia variação. A seguir mostraremos nossos resultados, análises e discussões.

5.1 Penetração da luz em 450 nm no leite puro e com diluições

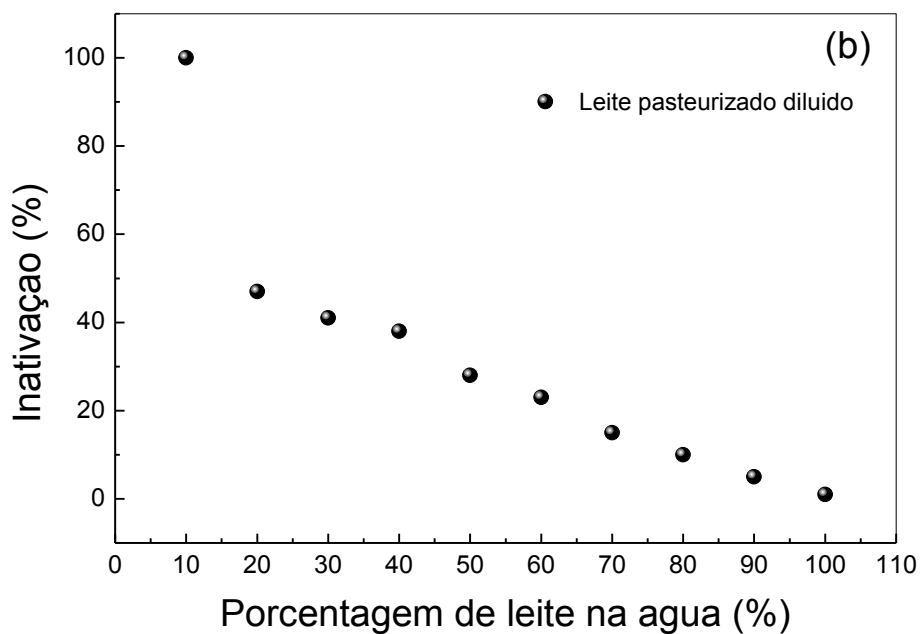
Nossos resultados microbiológicos foram obtidos em amostras diluídas de leite cru ou de leite pasteurizado (soluções aquosas). No entanto, tínhamos a curiosidade em saber se os valores de inativação permaneceriam os mesmos, caso nossa amostra não fosse diluída ou se variássemos a porcentagem de diluição. Essa investigação pode ser importante se o objetivo da inativação for para fins de comercialização do alimento. Realizamos medidas de inativação via IFD para diluições de 10% (solução com 90% de água destilada estéril e 10% de leite) até 100% (leite puro) com a nossa maior dose de luz 198 J/cm^2 . Na figura 27 mostramos as curvas de redução devido à IFD com a diminuição da diluição do leite: (a) leite cru e (b) leite pasteurizado.

Percebemos o rápido decaimento obtido nos dois primeiros valores de diluição. Esse decaimento permanece de forma mais lenta, mas no leite puro (100%) chega à inativação quase nula. Como o leite bovino é um meio turbido bastante espalhador (centros espalhadores de gorduras e proteínas), a radiação não alcança profundidades de penetração capazes de ativar o FS ou não ilumina o volume da solução completamente, restando material contaminado com *S. aureus*. Investigamos, então, a penetração dessa luz em *phantoms* que simulavam as soluções de leite usadas nesta dissertação (figura 28 (a)).

Figura 27: Variação da IFD em soluções aquosas de leite cru (a) e leite pasteurizado (b) iluminadas em 450 nm.

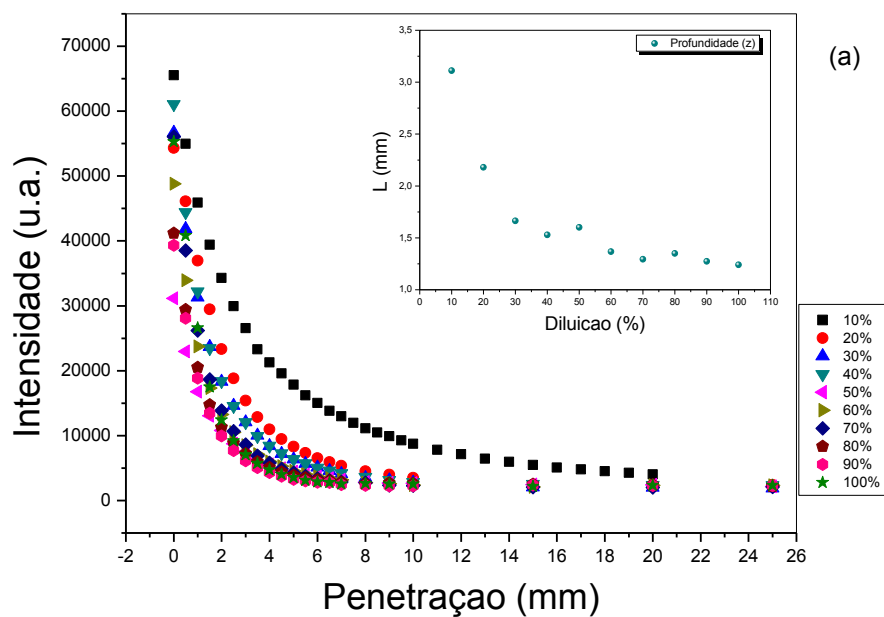


Fonte: Autor, 2015.

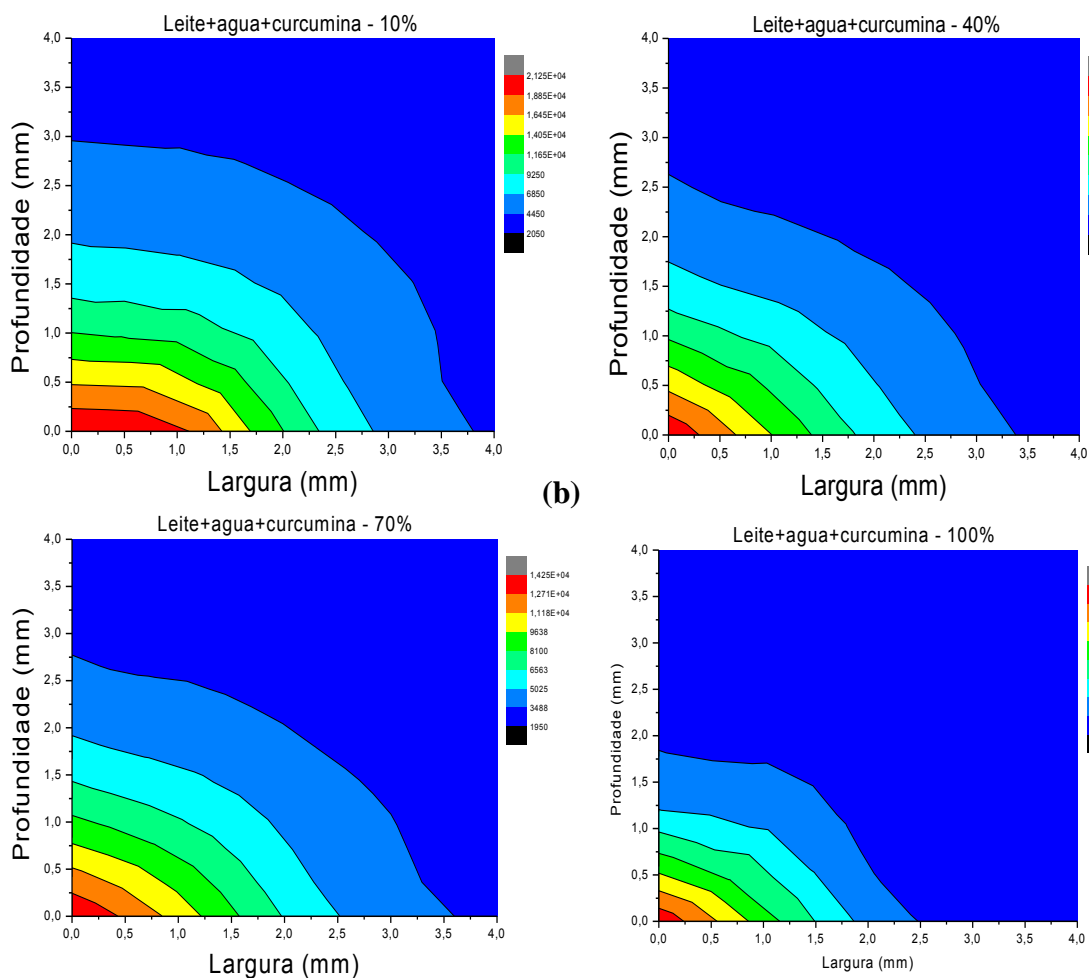


Fonte: Autor, 2015.

Figura 28: (a) Curvas de intensidades de luz nos *phantoms* para várias diluições do leite e no detalhe a penetração como função das diluições; (b) Curvas de isointensidade para diluições de 10%, 40%, 70% e 100%.



Fonte: Muniz Júnior, 2015.



Fonte: Muniz Júnior, 2015.

Nas medidas de profundidade de penetração nos *phantoms*, observamos comportamento decrescente exponencial para todas as diluições investigadas (10% a 100%). Para melhor visualização desses resultados traçamos algumas curvas de isointensidade, onde percebemos o quanto a luz se aprofunda e se espalha no meio (figura 28 (b)). Mostrando que os resultados obtidos aqui podem ser justificados também pelo fato do espalhamento e absorção estarem presentes juntos no meio biológico.

5.2 Avaliação da IFD no *S. aureus* seguindo a análise microbiológica

Resultados obtidos após a IFD para o leite cru e leite pasteurizado.

5.2.1 Leite Cru

Os resultados da avaliação da fotossensibilização letal do microrganismo *Staphylococcus aureus* através da IFD, utilizando como fotossensibilizador o Sal de Curcumina nas concentrações de 750, 1500 e 3000 mg/L, potências de 30, 60 e 110 mW do LED em 450 nm e com os tempos de 5 e 30 minutos.

As tabelas 11, 12 e 13 mostram a contagem das colônias microbianas para os grupos de estudo G1 (CONTROLE), G2 (CURCUMINA) e G4 (IFD) transformadas em \log_{10} (UFC/mL), obtidas após a realização do procedimento de inativação fotodinâmica do *Staphylococcus aureus* no leite cru.

Tabela 11: Medidas descritivas em \log_{10} (UFC/mL) para o grupo G1 (CONTROLE) e G2 (CURCUMINA) em leite cru.

Grupos	Concentrações (mg/mL)	\log_{10} (UFC/mL)
G1	-	6,20
G2	750	6,15
	1500	6,17
	3000	6,18

Fonte: Autor, 2015.

Considerando os resultados apresentados na Tabela 11, não houve uma redução expressiva bacteriana observada a partir do grupo G2 para as três concentrações de 750, 1500 e 3000 mg/L em relação ao grupo G1, mostrando que só com o Sal de Curcumina não há inativação.

Tabela 12: Medidas descritivas em Log₁₀ (UFC/mL) para o grupo G1 (CONTROLE) e o grupo G4 (IFD) para as potências de 30, 60 e 110 mW com o tempo de 5 minutos em leite cru.

Grupos	Concentrações (mg/mL)	Potência (mW)	Tempo (min)	Log ₁₀ (UFC/mL)
G1	-	-	-	6,20
G4	750	30	5	5,57
	1500			5,90
	3000			6,08
G4	750	60	5	4,23
	1500			5,73
	3000			5,88
G4	750	110	5	0,00
	1500			5,38
	3000			5,81

Fonte: Autor, 2015.

A partir da Tabela 12 começamos a obter reduções expressivas de colônias para a concentração de 750 mg/L com as três potências para o tempo de 5 minutos, onde com a maior potência (110 mW) se conseguiu redução total (< 1,0 UFC/ml) das colônias de *Staphylococcus aureus*, mostrando a eficiência da IFD.

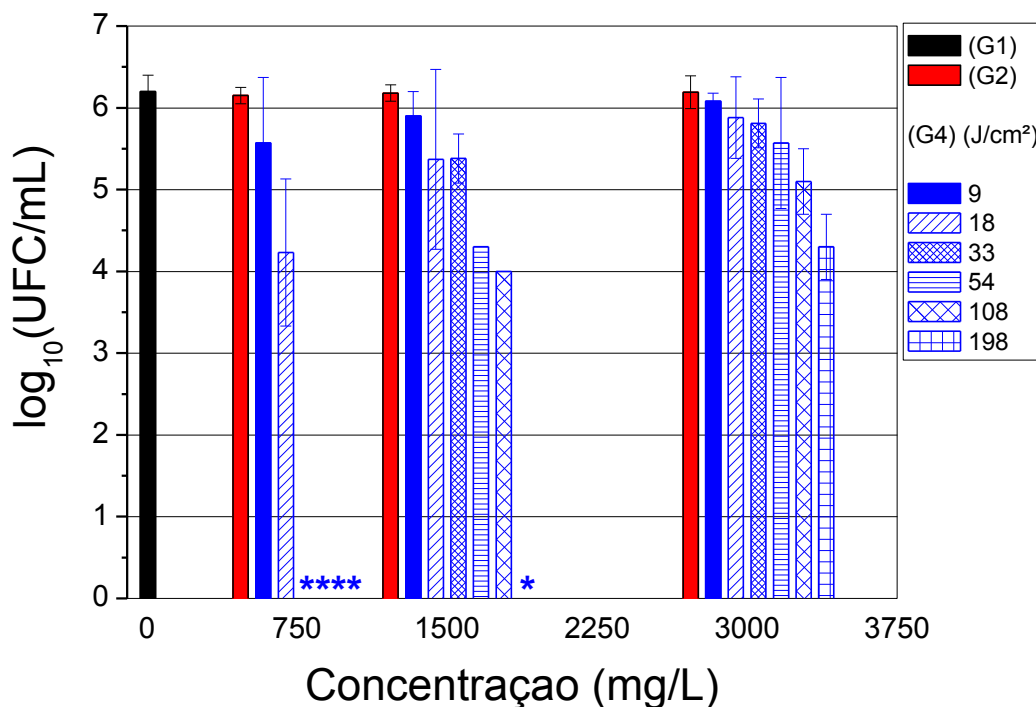
Tabela 13: Medidas descritivas em Log₁₀ (UFC/mL) para o grupo G1 (CONTROLE) e o grupo G4 (IFD) para as potências de 30, 60 e 110 mW com o tempo de 30 minutos em leite cru.

Grupos	Concentrações (mg/mL)	Potência (mW)	Tempo (min)	Log ₁₀ (UFC/mL)
G1	-	-	-	6,20
G4	750	30	30	0,00
	1500			4,30
	3000			5,58
G4	750	60	30	0,00
	1500			4,00
	3000			5,15
G4	750	110	30	0,00
	1500			0,00
	3000			4,30

Fonte: Autor, 2015.

Observando a tabela 13 percebe-se claramente que com a concentração de 750 mg/L obteve-se uma redução total das colônias do microrganismo (< 1,0 UFC/ml) para as três potências com o tempo de 30 minutos. Verificou-se também uma redução total das colônias (< 1,0 UFC/ml) na concentração de 1500 mg/L para a potência de 110 mW com o tempo de 30 minutos. A eficiência da inativação via IFD está claramente apresentada na tabela 13. A concentração de 750 mg/L, para as potências utilizadas neste trabalho, é demonstrada como a melhor concentração para inativar o *S. aureus*. Os resultados mostrados nas tabelas 11, 12 e 13 foram obtidos para as doses de luz de 9, 18, 33, 54, 108 e 198 J/cm², as quais foram calculadas a partir das potências, tempos de irradiação e área iluminada da amostra. A inativação do microrganismo *Staphylococcus aureus* está representada resumidamente no gráfico da Figura 29.

Figura 29: Avaliação das diferentes doses de luz na inativação do *S. aureus* no leite cru, variando as concentrações do FS para os grupos G2 (CURCUMINA) e G4 (IFD). Valores médios de \log_{10} (UFC/mL) e desvio-padrão.



Fonte: Autor, 2015.

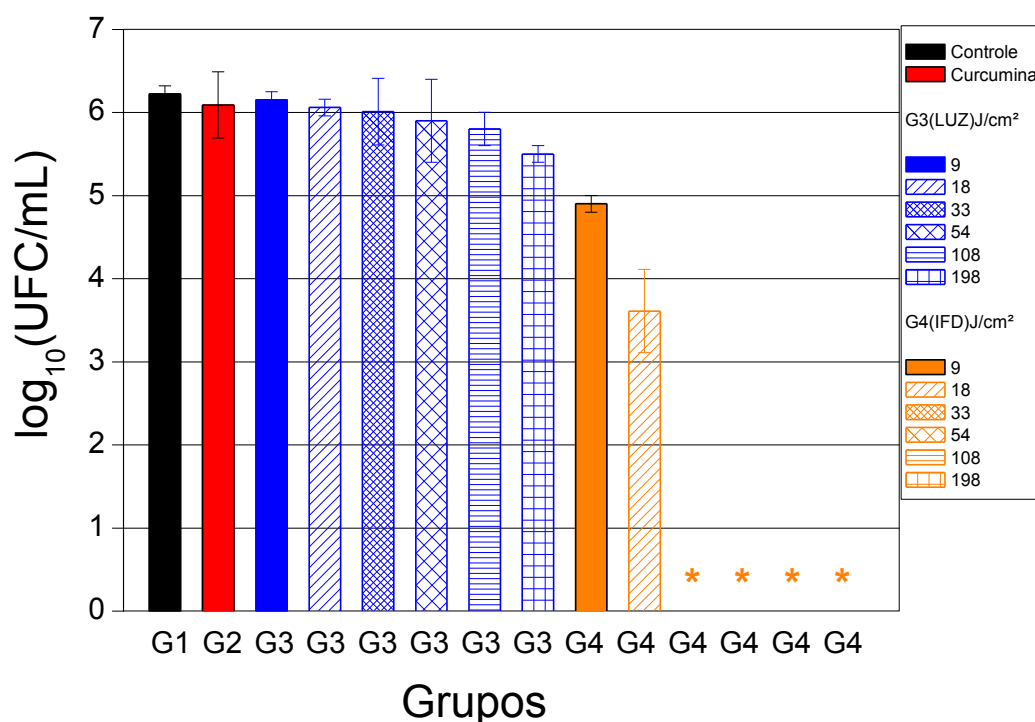
Todas as concentrações atuaram na inativação das colônias de *Staphylococcus aureus*, no entanto, a concentração 750 mg/L se destaca por ser a menor delas e mostrar-se a mais eficiente tanto no grupo G2 que só tem a adição do Sal de Curcumina, quanto no grupo G4 com uso combinado do Sal de Curcumina e dose de luz (IFD). Os resultados mais satisfatórios que se obteve neste trabalho para o leite cru foram os que estão marcados com o símbolo de (*) no gráfico da figura 29, onde se conseguiu redução total (< 1,0 UFC/ml) dos microrganismos.

As análises estatísticas foram realizadas pelos métodos ANOVA e teste de Tukey e não se verificou redução significativa do número de microrganismos presentes no grupo G2 (Somente Sal de Curcumina com tempo de incubação de 15 min) com as três concentrações de 750, 1500 e 3000 mg/L, ou seja, permaneceram constantes e não apresentaram uma redução significativa em relação ao grupo G1 (controle do microrganismo sem tratamento). Para um intervalo de 95% de confiança, os microrganismos nos quais foram realizados o processo de IFD nas concentrações de 750, 1500 e 3000 mg/L, mostraram diferença estatística significativa ($p < 0,05$), quando comparados aos controles experimentais.

Assim, a partir de agora serão analisados e discutidos os resultados obtidos sempre para a concentração de 750 mg/L, onde além dos três grupos anteriormente investigados (G1, G2 e G4), incluiremos mais um grupo, o G3 (LUZ), o qual só utiliza luz para a inativação. O experimento com as três concentrações foi realizado com placas de petri todas em triplicata. Para realizarmos a análise dos dados repetimos o experimento com todos os grupos usando seis placas de petri com colônias do microrganismo, obtivemos, então, os resultados mostrados para as concentrações. Agora já definida a concentração de 750 mg/L como a mais eficaz no quesito de inativação do microrganismo, repetimos o experimento para esta concentração mais três vezes, incluindo o grupo G3. Serão mostrados a seguir os resultados obtidos através da média dos cinco experimentos (em triplicata) e repetidos para os quatro grupos com o leite cru.

Na figura 30 apresentamos os resultados da inativação do microrganismo *Staphylococcus aureus* para os grupos G1, G2, G3 e G4, no leite cru na concentração de 750 mg/L do sal de Curcumina investigando as doses de 9, 18, 33, 54, 108 e 198 J/cm².

Figura 30: Investigação da inativação do *Staphylococcus aureus* no leite cru para as diferentes doses nos grupos G1 (CONTROLE), G2 (CURCUMINA), G3 (LUZ) e G4 (IFD).



Fonte: Autor, 2015.

Estão disponíveis no anexo 1 as fotos das placas de Petri utilizadas para a inativação por grupo.

Na Figura 30 representamos o grupo G1 como o log do número de colônias de bactérias presente nas placas de Petri antes de qualquer tratamento, seja com FS, com irradiação de luz ou com a combinação destes (IFD). Adicionando o FS obtém-se o grupo G2 que utiliza somente o FS para a inativação. Incidindo somente as doses de luz (9, 18, 33, 54, 108 e 198 J/cm²) temos o grupo G3 e para o combinado de dose de luz e FS, temos o grupo G4.

Analisando a figura 30 observa-se que não tivemos uma redução expressiva no grupo G2 ao comparar com o grupo G1, porém ao usar somente luz, grupo G3, começamos a constatar uma leve redução a partir da dose mais alta de 198 J/cm² (menos de 1 log de inativação) nos levando a acreditar que o aumento da dose de luz influencia na inativação dos microrganismos. No grupo G4, a partir da primeira dose de luz (9 J/cm²), se obtém mais colônias inativadas do que com a maior dose de luz no grupo G3 (198 J/cm²), intensificando a inativação com o aumento da dose de luz, que a partir de 33 J/cm² observamos inativação total das colônias de *Staphylococcus aureus* (6,2 log de inativação) (*). Esse resultado mostra a eficiência da técnica IFD na inativação de *S. aureus* em leite cru.

As análises estatísticas foram realizadas para os microrganismos nos quais foram aplicados uma das doses de luz (G3) e os que foram submetidos ao processo de IFD (G4) na concentração de 750 mg/L e mostraram diferença estatística significativa ($p < 0,05$), quando comparado ao controle experimental (G1).

5.2.2 Leite Pasteurizado

Do mesmo modo foram avaliados os resultados da ação fotodinâmica no microrganismo *Staphylococcus aureus* através da IFD, utilizando como fotossensibilizador o Sal de Curcumina nas concentrações de 750, 1500 e 3000 mg/L, potências 30, 60 e 110 mW do LED em 450 nm e para os tempos de 5 e 30 minutos.

As tabelas 14, 15 e 16 mostram a contagem das colônias de bactérias para os grupos de estudo G1 (CONTROLE), G2 (CURCUMINA) e G4 (IFD) transformadas em log₁₀ (UFC/mL), obtidas após a realização do procedimento de inativação fotodinâmica do *Staphylococcus aureus* no leite pasteurizado.

Tabela 14: Medidas descritivas em Log₁₀ (UFC/mL) para o grupo G1 (CONTROLE) e G2 (CURCUMINA) em leite pasteurizado.

Grupos	Concentrações (mg/MI)	Log ₁₀ (UFC/MI)
G1	-	6,32
G2	750	6,26
	1500	6,18
	3000	6,20

Fonte: Autor, 2015.

Ao avaliarmos os resultados apresentados na Tabela 14, não houve uma redução bacteriana expressiva no leite pasteurizado observada a partir do grupo G2 para as três concentrações de 750, 1500 e 3000 mg/L em relação ao grupo G1, enfatizando que só a ação do Sal de Curcumina não inativa *S. aureus* em leite pasteurizado.

Tabela 15: Medidas descritivas em Log₁₀ (UFC/mL) para o grupo G1 (CONTROLE) e o grupo G4 (IFD) para as potências de 30, 60 e 110 mW com o tempo de 5 minutos em leite pasteurizado.

Grupos	Concentrações (mg/mL)	Potência (mW)	Tempo (min)	Log ₁₀ (UFC/mL)
G1	-	-	-	6,32
G4	750	30	5	6,08
	1500			6,15
	3000			6,11
G4	750	60	5	5,36
	1500			5,93
	3000			5,96
G4	750	110	5	0,00
	1500			5,56
	3000			5,95

Fonte: Autor, 2015.

A partir da Tabela 15 começamos a observar uma leve redução de colônias para a concentração de 750 mg/L para as potências de 30 e 60 mW com o tempo de 5 minutos, mas com a maior potência (110 mW) se conseguiu redução total ($< 1,0$ UFC/ml) das colônias de *Staphylococcus aureus* (6,32 log de inativação). Para as outras concentrações os valores de inativação foram inferiores em consideração a de 750 mg/L. Podendo esse fato ser explicado devido as doses mais altas de FS causarem saturação dos sítios de ligação provocando uma baixa atuação da IFD, produzindo menores efeitos fototerápicos, já que os sítios de ligação do composto às células tornam-se saturados [132, 133].

Tabela 16: Medidas descritivas em Log_{10} (UFC/mL) para o grupo G1 (CONTROLE) e o grupo G4 (IFD) para as potências de 30, 60 e 110 mW com o tempo de 30 minutos em leite pasteurizado.

Grupos	Concentrações (mg/mL)	Potência (mW)	Tempo (min)	Log_{10} (UFC/mL)
G1	-	-	-	6,32
G4	750	30	30	0,00
	1500			4,60
	3000			5,34
G4	750	60	30	0,00
	1500			4,00
	3000			4,88
G4	750	110	30	0,00
	1500			4,00
	3000			4,30

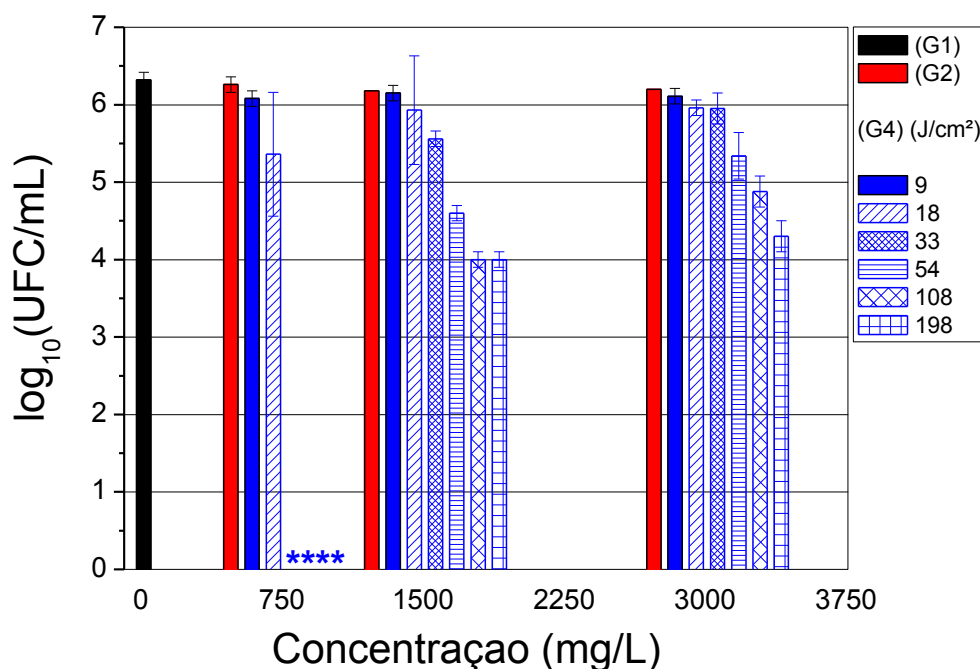
Fonte: Autor, 2015.

Considerando os resultados obtidos a partir da tabela 16 percebe-se claramente que com a concentração de 750 mg/L obteve-se uma redução total das colônias do microrganismo ($< 1,0$ UFC/ml) para as três potências com o tempo de 30 minutos. Porém, diferente do leite

cru, não foi verificado a redução total das colônias na concentração de 1500 mg/L para a potência de 110 mW, o que diferencia os resultados do leite cru para o leite pasteurizado. Diante dos resultados é verificada a concentração de 750 mg/L como a mais eficaz.

Assim como no leite cru os resultados mostrados nas tabelas 14, 15 e 16 para o leite pasteurizado podem ser expressos como as concentrações do fotossensibilizador Sal de Curcumina (750, 1500 e 3000 mg/L) em função das doses de luz (9, 18, 33, 54, 108 ou 198 J/cm²) utilizadas na inativação do microrganismo *Staphylococcus aureus*. No gráfico da figura 31 apresentamos um resumo dos resultados alcançados.

Figura 31: Avaliação das diferentes doses na inativação do *Staphylococcus aureus* no leite pasteurizado, variando as concentrações do FS para os grupos G2 (CURCUMINA) e G4 (IFD). Valores médios de log₁₀ (UFC/mL) e desvio-padrão.



Fonte: Autor, 2015.

Semelhante ao leite cru todas as concentrações no leite pasteurizado atuaram na inativação das colônias de *Staphylococcus aureus*, no entanto, a concentração de 750 mg/L se destaca por ser a menor delas e se mostrar a mais eficiente tanto no grupo G2 que só tem a adição do Sal de Curcumina, quanto no grupo G4 que utiliza o uso combinado do sal de curcumina e da dose de luz (IFD).

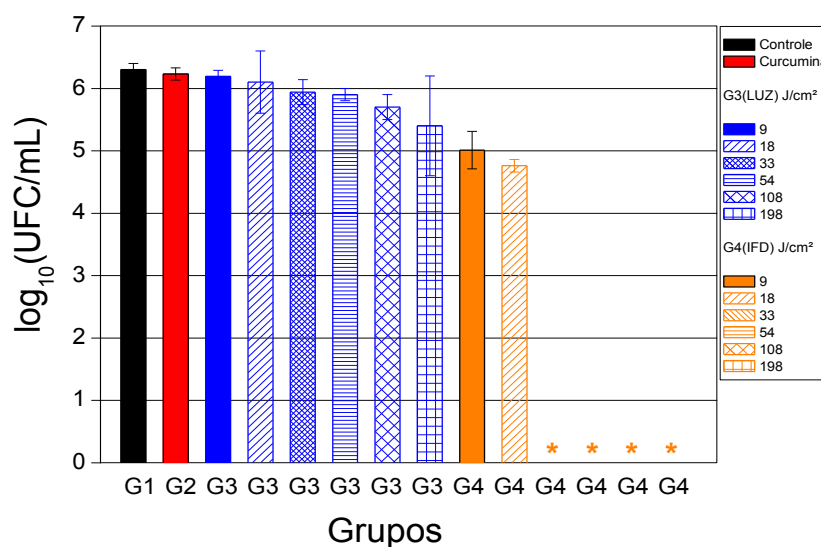
Os resultados mais satisfatórios que se obteve para o leite pasteurizado foram os que estão marcados com o símbolo de (*) no gráfico (figura 31) onde se conseguiu redução total

(< 1,0 UFC/ml segundo a estatística microbiológica) dos microrganismos que foram obtidos através do grupo G4 na concentração de 750 mg/L com doses de 33, 54, 108 e 198 J/cm². Diferentemente do leite cru não se obteve inativação total com a concentração de 1500 mg/L com a dose de 198 J/cm².

Estatisticamente não foi verificada redução significativa do número de microrganismos presentes no grupo G2 (Somente Sal de Curcumina com tempo de incubação de 15 min) com as três concentrações de 750, 1500 e 3000 mg/L, ou seja, permaneceram constantes e não apresentaram um decaimento significativo em relação ao grupo G1 (controle do microrganismo sem tratamento) similar ao resultado obtido no leite cru. Na IFD nas concentrações de 750, 1500 e 3000 mg/L, foi observado diferença estatística significante ($p < 0,05$), quando comparados aos controles experimentais.

A partir de agora serão analisados e discutidos os resultados obtidos unicamente para a concentração de 750 mg/L, onde serão utilizados os três grupos anteriores G1, G2 e G4 incluindo, também, o grupo G3 (LUZ) que não foi considerado na análise da concentração devido a ele não utilizar fotossensibilizador. O experimento com as três concentrações foi realizado com placas de petri todas em triplicata e, para a análise dos dados, repetimos o experimento duas vezes onde obtivemos 6 (seis) amostragens para todos os grupos. Agora, já definida a concentração de 750 mg/L como a mais eficaz, repetimos o experimento para esta concentração mais três vezes, incluindo o grupo G3 (LUZ) (figura 31).

Figura 32: Avaliação das diferentes doses na inativação do *Staphylococcus aureus* no leite pasteurizado, variando os grupos G1 (CONTROLE), G2 (CURCUMINA), G3 (LUZ) e G4 (IFD).



Estão disponíveis no anexo 2 as fotos das placas de Petri utilizadas para a inativação por grupo.

Com os resultados obtidos na figura 32 observa-se que não tivemos uma redução expressiva no grupo G2 ao comparar com o grupo G1, porém ao usar somente luz (grupo G3) começamos a constatar uma leve redução a partir da dose mais alta de 198 J/cm², já que para as outras doses de luz não foi verificado inativação relevante, nos levando a acreditar que o aumento da dose de luz influencia na inativação dos microrganismos. Com o grupo G4 a partir da primeira dose de luz com a concentração de FS em 750 mg/L obtém-se mais colônias inativadas do que com a maior dose de luz no grupo G3, intensificando a inativação com o aumento da dose de luz, que a partir de 33 J/cm² começamos a ter inativação total das colônias de *Staphylococcus aureus* (6,32 log de inativação). Novamente, observamos a eficácia da Inativação Fotodinâmica e comprovamos a ação do sal de Curcumina como fotossensibilizador.

No entanto, devido ao tempo de irradiação de 30 minutos e a doses mais altas de luz, como por exemplo, 198 J/cm², a inativação dos microrganismos poderia estar associada a efeitos térmicos e não somente a efeitos fotoquímicos presentes na IFD. Para sanar dúvidas surgidas na análise dos resultados, investigamos para ambos os tipos de leite e todas as doses de luz, a variação térmica sofrida pelas amostras durante todos os processos. Essa investigação será mostrada na próxima seção.

5.2.3 Teste Térmico

Na inativação fotodinâmica (IFD) com doses de luz elevadas efeitos térmicos também podem contribuir para intensificar a inativação ou a bioestimulação do microrganismo junto com os efeitos fotodinâmicos. Para avaliar esse efeito realizaram-se medidas da variação de temperatura nas amostras de leite cru e leite pasteurizado no momento da IFD de $t_i = 0$ min até $t_f = 30$ min para as três potências utilizadas neste trabalho. Repetimos as medidas três vezes para cada potência e logo após foi calculada a média aritmética e o desvio padrão (tabela 17).

Tabela 17: Temperatura a cada minuto para cada potência durante a IFD.

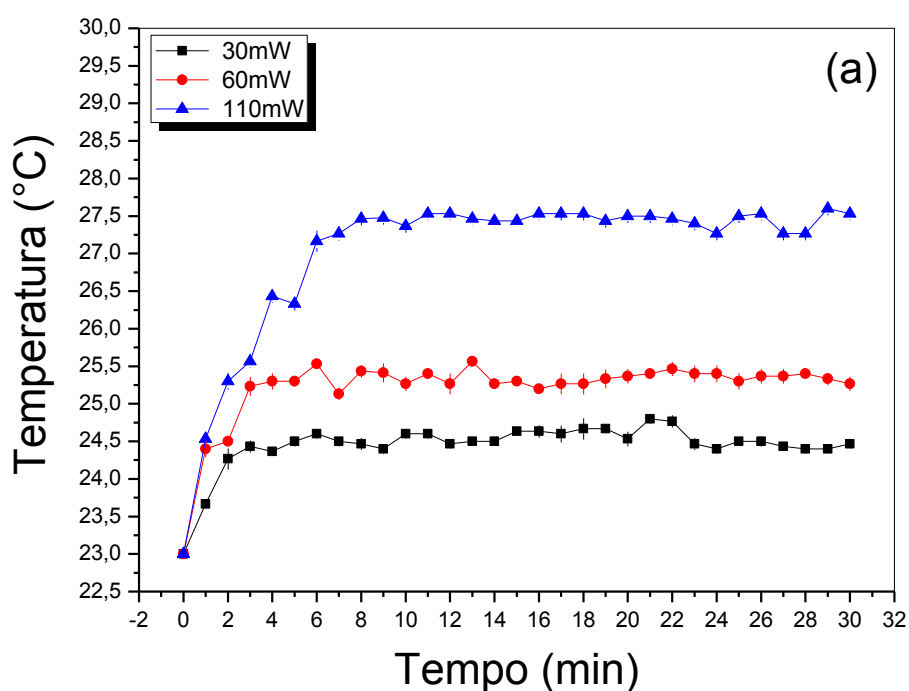
	Leite Cru			Leite Pasteurizado		
	Potência (mW)			Potência (mW)		
	30	60	110	30	60	110
Tempo (min)	Temperatura Média (°C)			Temperatura Média (°C)		
0	23	23	23	23	23	23
1	23,6	24,4	24,5	23,2	23,6	24,3
2	24,2	24,5	25,3	23,3	24,2	25,2
3	24,4	25,2	25,5	23,5	24,4	25,6
4	24,3	25,3	26,3	23,6	24,5	26,2
5	24,5	25,3	26,4	23,7	24,6	26,4
6	24,6	25,5	27,1	23,7	24,7	27,2
7	24,5	25,1	27,2	23,7	25,2	27,4
8	24,4	25,4	27,4	23,8	25,2	27,3
9	24,4	25,4	27,4	23,9	25,3	27,4
10	24,6	25,2	27,3	24,0	25,3	27,5
11	24,6	25,4	27,5	24,2	25,4	27,6
12	24,4	25,2	27,5	24,2	25,2	27,4
13	24,5	25,5	27,4	24,2	25,3	27,2
14	24,5	25,2	27,4	24,3	25,3	27,3
15	24,6	25,3	27,4	24,4	25,6	27,2
16	24,6	25,2	27,5	24,5	25,6	27,6
17	24,6	25,2	27,5	24,6	25,9	28,3
18	24,6	25,3	27,4	24,6	25,9	28,3
19	24,6	25,3	27,5	24,6	25,9	28,3
20	24,6	25,3	27,4	24,6	25,9	28,3
21	24,5	25,3	27,5	24,6	25,9	28,4
22	24,8	25,4	27,5	24,6	25,5	28,3
23	24,7	25,4	27,4	24,7	25,5	28,3
24	24,4	25,4	27,4	24,7	25,6	28,5

25	24,4	25,4	27,2	24,7	25,9	28,4
26	24,5	25,3	27,5	24,8	25,7	28,3
27	24,5	25,3	27,5	24,7	26,2	28,2
28	24,4	25,3	27,2	24,6	26,2	27,9
29	24,4	25,4	27,2	24,6	26,1	28,1
30	24,4	25,3	27,6	24,6	26,3	28,4

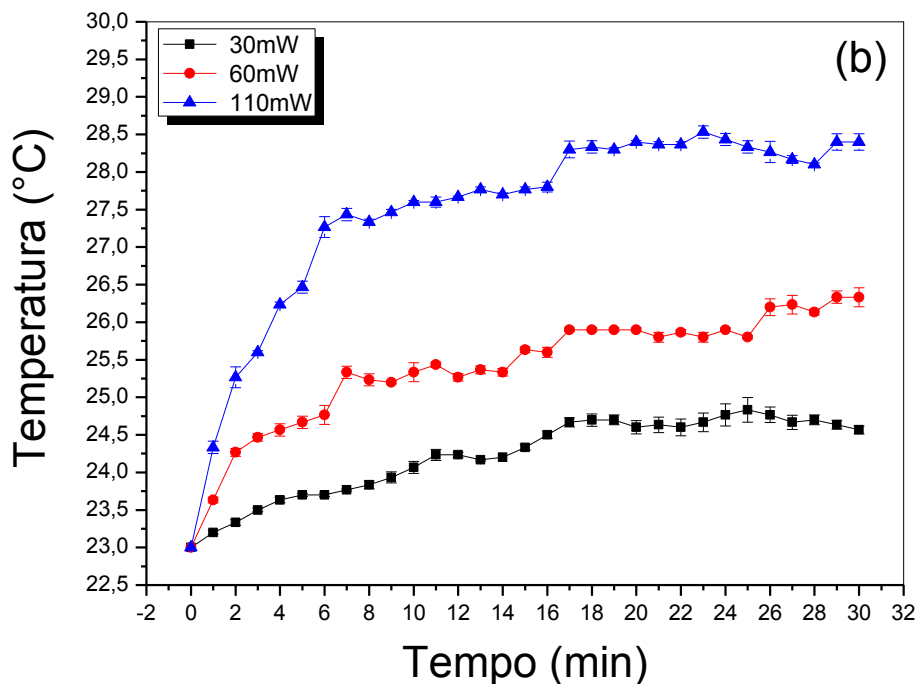
Fonte: Autor, 2015.

Utilizando a equação (4.2), obtivemos as variações de temperatura para o leite cru e o leite pasteurizado. Como resultado para o leite cru, obteve-se para 5 minutos um aumento de 3,4 °C com a potência de 110 mW e para o tempo de 30 minutos com a mesma potência verificou-se um aumento de 4,6 °C. Para o leite pasteurizado as variações de temperatura foram 3,4 °C e 5,4 °C, respectivamente. Na figura 33(a) e 33(b) observamos saturação de temperatura para as três curvas, mostrando que mesmo que expuséssemos o meio há tempos mais longos, não haveria mudança na temperatura para as três potências usadas.

Figura 33: Variações de temperatura sofridas pelo Leite Cru (a) e Leite Pasteurizado (b) no intervalo de 0 a 30 min durante IFD.



Fonte: Autor, 2015.



Fonte: Autor, 2015.

Para o caso da inativação de microrganismos, foi mostrado no capítulo 3 o processo de pasteurização, onde ocorre a morte microbiana utilizando o aumento de temperatura (72 a 75 °C) e o resfriamento (4 °C) [122]. Em nossas investigações verificou-se que a máxima temperatura obtida com a maior dose de luz (198 J/cm²) foi de 28,4 °C, muito aquém da temperatura necessária para inativação térmica.

Uma forma de verificar a ocorrência da bioestimulação seria se o controle, grupo G1, mostrasse menor número de colônias de bactérias do que um dos grupos (G3 ou G4) tratados com alguma das seis doses de luz utilizadas na inativação, o que não ocorreu em nenhum dos resultados mostrados.

Outra preocupação no uso de técnicas para inativação de microrganismos em alimentos é manter seu teor proteico. Fizemos, então, um teste de teor proteico nos leites cru e pasteurizado, antes e após a aplicação da IFD. Os resultados são mostrados na seção 5.4 a seguir.

5.2.4 Teor de Proteína

A determinação do teor de proteína foi realizada para o leite cru e leite pasteurizado antes e após a IFD. O procedimento foi feito em duplicata e os resultados são mostrados na tabela 18, abaixo:

Tabela 18: Porcentagem de proteína contida no leite cru e no leite pasteurizado antes e após a IFD.

Leite Cru (%)		Leite Pasteurizado (%)	
Antes da IFD	Depois da IFD	Antes da IFD	Depois da IFD
3,5	3,4	3,0	2,9
3,4	3,3	2,9	2,9
Média (%)		Média (%)	
3,45	3,35	2,95	2,9

Fonte: Autor, 2016.

Analisando as medias dos resultados descritos na tabela 18, observamos que tanto para o leite cru quanto para o leite pasteurizado não houve diferença significativa na quantidade de proteínas antes e após a IFD, significando que o processo de inativação fotodinâmica não interfere na composição do leite. Podemos ainda avaliar o desempenho desse teste proteico verificando que, segundo Tronco [120], a porcentagem de proteínas encontradas no leite é geralmente de 3,5%. Uma investigação cogitada após o teste proteico seria o teste de prateleira, que seria avaliar a cor e o sabor desse leite após a aplicação da IFD e a sua aceitação no mercado comercial. No entanto, o leite com açafraão já é uma bebida consumida em algumas regiões da Índia (bebida conhecida como *leite dourado*), então tanto a cor quanto o sabor já foram testados e aceitos.

Diante dos resultados apresentados neste capítulo, podemos dizer que a IFD é uma técnica de inativação de microrganismos eficiente e não altera a constituição proteica do meio investigado. Apresentaremos no próximo capítulo as conclusões a cerca de cada etapa desenvolvida neste trabalho.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados experimentais apresentados e de acordo com a metodologia empregada, foi possível concluir.

O primeiro estudo realizado foi para definir a concentração que mais se destacaria na IFD. Realizamos a investigação com três concentrações 750, 1500 e 3000 mg/L para o leite cru e o leite pasteurizado verificando que para os dois tipos de leite a concentração de 750 mg/L se mostrou a mais eficiente para todos os grupos (G1, G2, G3 e G4). Outras concentrações mais baixas (por exemplo, 250 mg/L) foram testadas anteriormente em nosso grupo de pesquisa com inativação de *S. aureus* em queijo coalho, mas o resultado foi insignificante diante da concentração de 750 mg/L.

Após a primeira etapa foi incluso nas análises o grupo G3, onde começamos a avaliar a ação da luz sobre o meio. Percebeu-se que o grupo mais eficiente na inativação dos microrganismos foi o G4 (IFD) para as doses de (33, 54, 108 e 198 J/cm²) para os dois tipos de leite. Sendo que no grupo G4, na concentração de 1500 mg/L com a dose de luz de 198 J/cm², também obtivemos inativação total das colônias de *S. aureus*. Mostrando que não basta ter somente a dose de luz com um LED em 450 nm ou o fotossensibilizador Sal de Curcumina, o uso combinado dessas ferramentas é o essencial na eficiência da IFD. Obtivemos valores de até 6,32 logs de inativação fotodinâmica, resultado esse que está em perfeita concordância com as maiores inativações de microrganismo encontradas na literatura.

Uma preocupação que sempre surge quando usamos luz como ferramenta de inativação e tempos longos de exposição são os possíveis efeitos térmicos ocorrerem no momento da aplicação do grupo G3 ou G4, com o aumento das doses de luz, porém esta questão foi sanada quando observamos que para a maior potência utilizada de 110 mW o aumento de temperatura não provocava aquecimento significativo da amostra. Com isso concluímos que efeito térmico e/ou bioestimulação estava descartado na resistência ou inativação microbiana. Outra questão investigada foi se a inativação fotodinâmica interferia no valor proteico do leite cru ou pasteurizado, sendo que para os valores encontrados durante o teste proteico não se verificou valores consideráveis entre a aplicação do processo fotodinâmico e as proteínas contidas no leite.

Verificamos também como o leite se comportava ao aumentarmos sua concentração com relação à penetração de luz no meio biológico. Verificamos que a inativação com o grupo G4 se reduzia conforme a concentração de leite na solução aumentava. Para uma melhor visualização do comportamento, simulamos as soluções aquosas do leite com o sal de

Curcumina, incidimos luz e investigamos a penetração da luz no sentido e perpendicularmente à incidência do feixe luminoso, a partir daí, traçamos curvas de isointensidade para verificar como essa luz perdia seu poder de penetração e como se espalhava na superfície a partir do aumento da concentração de leite na solução. Observamos decaimentos exponenciais devido ao aumento da concentração de centros espalhadores do leite (gordura e proteínas).

Com este trabalho foi possível concluir que ao aplicarmos a IFD no leite cru e pasteurizado levando em conta o tipo de fotossensibilizador, a sua concentração, a dose de luz utilizada, o tempo de incubação do FS, o microrganismo e a concentração de leite, a Inativação Fotodinâmica (IFD) se mostrou uma excelente técnica com grande potencial para a inativação do *S. aureus* tanto no leite cru quanto no pasteurizado. Podemos esperar que a inativação fotodinâmica aplicada em outro tipo de alimento aja de forma eficaz na inativação desse microrganismo e em outras bactérias.

Podemos sugerir ainda como perspectivas futuras a aplicação dessa terapia na descontaminação de outros alimentos e buscar fatores que sejam favoráveis à inativação de microrganismos Gram-negativos, como por exemplo, a bactéria *E. coli*.

REFERÊNCIAS

1. GOLDMAN, M. P.; Terapia Fotodinâmica, Série Procedimentos em Dermatologia Cosmética, *Saunders / Elsevier*, cap.1, Mecanismo de Ação do Ácido Aminolevulínico Tópico, p. 1-12, 2007.
2. PATRICE, T. *Photodynamic Therapy*. France: Advance the Chemical Sciences, 2013. ISBN 0-85404-306-3.
3. HAMBLIN, M. R. *Advances in photodynamic therapy: basic, translational, and clinical*. Artech House, 2008.
4. ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.
5. BAGNATO, V. S. *Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde*. São Paulo: Livraria da Física, 2008.
6. MAISCH, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers in Medical Science*, v. 22, n. 2, p. 83-91, 2007.
7. RAAB, O. Ueber die Wirkung fluorizierender Stoffe auf Infusorien. *Z. Biol.* n. 39, p. 524-546, 1900.
8. JORI, G.; BROWN, S. B. Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochemical and Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, n. 3, p. 403-405, 2004.
9. HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical and Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, n. 3, p. 436-450, 2004.
10. WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, n. 42, p. 13-28, 1998.
11. BONNETT, R. Chemical aspects of photodynamic therapy. Singapore: *Gordon and Breach Science publishers*; 2000.
12. WAINWRIGHT, M. 'Safe' Photoantimicrobials for Skin and Soft-Tissue Infections. *Int. J. Antimicrob Agents*, n. 36, p. 14-18, 2010.
13. GAD, F.; ZAHRA, T.; HAMBLIN, M. R. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother*, n. 6, p. 2173-2178, 2004.

14. FOOTE, C. Definition of Type I and Type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol*, n. 54, p. 659, 1991.
15. PHILLIPS, D. Chemical mechanisms in photodynamic therapy with phthalocyanines. *Progress Reactions Kinetics*, n. 22, p. 175-300, 1997.
16. OTONI, E. S. B.; NARDIN, J. M. Avaliação da citotoxicidade de curcuminóides em células linfocitárias normais. *Saúde*, v. 1, n. 11, 2014.
17. FREDEEN, A. H. Considerations in the milk nutritional modification of milk composition. *Animal Feed Science Technology*, v. 59, n. 1, p. 185-197, 1996.
18. WIKENE, K. O. et al. Formulation and characterization of lyophilized curcumin solid dispersions for antimicrobial photodynamic therapy (aPDT): studies on curcumin and curcuminoids LII. *Drug development and industrial pharmacy*, v. 41, n. 6, p. 969-977, 2015.
19. RIBEIRO, A. P. D. et al. Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts. *Lasers in medical science*, v. 28, n. 2, p. 391-398, 2013.
20. JIANG, Yuan et al. Photodynamic action of LED-activated curcumin against *Staphylococcus aureus* involving intracellular ROS increase and membrane damage. *International Journal of Photoenergy*, v. 2014, 2014.
21. PASCHOAL, M. A. et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Streptococcus mutans* using curcumin and toluidine blue activated by a novel LED device. *Lasers in medical science*, v. 30, n. 2, p. 885-890, 2015.
22. DA FROTA, M. F. et al. Photodynamic therapy in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis* using curcumin as photosensitizer. *Lasers in medical science*, p. 1-6, 2014.
23. TORTIK, N.; SPAETH, A.; PLAETZER, K. Photodynamic decontamination of foodstuff from *Staphylococcus aureus* based on novel formulations of curcumin. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 13, n. 10, p. 1402-1409, 2014.
24. PILEGGI, G. et al. Blue light-mediated inactivation of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, v. 10, n. 2, p. 134-140, 2013.
25. WHO. Antimicrobial resistance. Disponível em: <<http://www.who.int/drugresistance/en/>>. Acessado em: 20 set. 2015.
26. NIEMZ, M. H. *Laser-Tissue Interactions: Biological and medical physics, biomedical engineering*. 3ª ed. Springer, 2003.
27. TUCHIN, V. V. *Handbook of photonics for biomedical science*. Boca Raton, FL: CRC Press. 2003.
28. VO-DINH, TUAN. *Biomedical Photonics Handbook*, Editorial CRC, USA (2003) ISBN 0-8493-1116-0.

29. SHARMA, K. K. *Optics: Principles and Applications*. California-USA. 1ª ed. Elsevier Inc. 2006.
30. NIEMZ, M. H. *Laser-tissue interactions*. Berlin: Springer, 2007.
31. VALEUR, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Germânia: WILEY-VCH, 2002.
32. BOHREN, C. F.; HUFFMAN, D. R. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. New York: Wiley, 1983.
33. PRASAD, P. N. *Introduction to Biophotonics*. New Jersey. Wiley Interscience, 2003.
34. JACQUES, S. L.; PRAHL, S. A. *Introduction to Biomedical Optics*. Disponível em: <<http://omlc.org/classroom/ece532/class3/index.html>>. Acessado em: 20 dez. 2015.
35. JACQUES, S. L.; ALTER, C. A.; PRAHL, S. A. Angular dependence of HeNe laser light scattering by human dermis, *Lasers Life Sci*, v. 1, p. 309-333, 1987.
36. ARNFIELD, M. R.; TULIP, J.; MCPHEE, M. S. Optical propagation in tissue with anisotropic scattering, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, n. 35, p. 372-381, 1988.
37. DAM, J. S. Optical analysis of biological media - continuous wave techniques. *Lund Reports on Atomic Physics LRAP*, p. 265, 2000. ISBN 91-628-4546-2.
38. ISHIMARU, A. *Wave propagation and scattering in random media*. New York: Academic Press, 1978.
39. ISHIMARU, A. Diffusion of Light in Turbid Material. *Applied Optics*, v. 28, p. 2210-2215, 1989.
40. PATTERSON, L. R. *The nature of copyright: A law of users' rights*. University of Georgia Press, 1991.
41. WELCH, A, VAN GEMERT, M. J. C. *Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue*. 2nd. Springer, 2011.
42. PENG, Q. et al. *Lasers in Medicine*. *Rep Prog Phys*, n. 71, p. 1-28, 2008. (doi:10.1088/0034-4885/71/5/056701).
43. BOULNOIS, J. L. Photophysical processes in recent medical laser developments: a review. *Lasers in Medical Science*, v. 1, n. 1, p. 47-66, 1986.
44. THOMSEN, S. Pathologic analysis of photothermal and photomechanical effects of laser-tissue interactions. *Photochem Photobiol*, n.53, p. 825-35, 1991.
45. JACQUES, S. The role of tissue optics and pulse duration during high-power laser irradiation. *Appl Opt*, n. 32, p. 2447-54, 1993.

46. STEINER, R. Laser and IPL Technology in Dermatology and Aesthetic Medicine, p. 23-36, 2010.
47. PRIME, J. Les axidentes toxiques par l'eosinate de sodium. *Jouve and Boyer*, Paris, 1901.
48. OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. v. 39 p. 1-18, 1997.
49. PERVAIZ, S. Reactive Oxygen-Dependent Production of Novel Photochemo-therapeutic Agents. *The FASEB Journal*, n. 15, p. 612-617, 2001.
50. DOUGHERTY, T. J. et al. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J. Natl Cancer Inst*, v. 55, p. 115-21, 1975.
51. KELLY, J. F.; SNELL, M. E.; BERENBAUM, M. C. Photodynamic destruction of human bladder carcinoma. *Br J Cancer*, v. 31, p. 237-44, 1975.
52. WEISHAUPT, K. R. et al. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photodynamic inactivation of a murine tumor. *Cancer Research*. v. 36 p. 2326-29, 1976.
53. TEDESCO, A. C. Processos Fotodinâmicos: "A Luz" de uma nova terapia aplicada à saúde humana. *Jornal Brasileiro de Laser*, v. 1, n. 4, p. 32-41, Out/2007.
54. STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRÜCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron*. n. 54: p. 4151- 4202, 1998.
55. LEE, Y.; BARON, E. D. Photodynamic therapy: current evidence and applications in dermatology. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, v. 30, n. 4, p. 199-209, 2011.
56. KESSEL, D. Photodynamic therapy: from the beginning. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 1, n. 1, p. 3-7, 2004.
57. RYSKOVA, L.; BUCHTA, V.; SLEZAK, R. Photodynamic antimicrobial therapy. *Central European Journal of Biology*, n. 5, p. 400-406, 2010.
58. TAPPEINER, H. V.; JODLBAUER, A. Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Infusorien *Dtsch Arch Klin. Med*, n. 80, p. 427-487, 1904.
59. JORI, G. Photodynamic Therapy of Microbial Infections: State of the Art and Perspectives. *J. Environ Pathol Toxicol Oncol*, n. 25, p. 505-519, 2006.
60. DECRAENE, V., PRATTEN, J.; WILSON, M. Assessment of the Activity of a Novel Light-Activated Antimicrobial Coating in a Clinical Environment. *Infect Control Hosp Epidemiol*, n. 29, p. 1181-1184, 2008.
61. MINNOCK, A.; et al. Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, n. 44, p. 522-527, 2000.

62. TORTORA, G. J.; FUNKE R. B.; CASE C. L. *Microbiologia*. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
63. MITTON, D.; ACKROYD, R. A Brief Overview of Photodynamic Therapy in Europe. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, n. 5, p. 103-111, 2008.
64. PERVAIZ, S.; OLIVO, M. Art and science of photodynamic therapy. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, v. 33, p. 551-556, 2006.
65. WILSON, M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *The Journal of Applied Bacteriology*, v. 75, p. 299-306, 1993.
66. CALIN, M. A.; PARASCA, S. V. Light sources for photodynamic inactivation of bacteria. *Lasers in Medical Science*, v. 24, p. 453-460, 2009.
67. ACKROYD, R.; et al. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, v. 74, p. 656-669, 2001.
68. CALIN, M. A.; PARASCA, S. V. Light sources for photodynamic inactivation of bacteria. *Lasers in Medical Science*, v. 24, p. 453-460, 2009.
69. KARU, T. *Low-Power Laser Therapy. Biomedical Photonics Handbook*. v. 1, p. 48-20, 2003.
70. BRUGNERA, Jr. A. et al. *Laserterapia aplicada à clínica odontológica*. São Paulo: Santos, 2003. p. 78.
71. GRECCO, C. et al. Physics of lasers and LEDs. *Lasers in Dentistry*. p. 1-10. 2015. doi: 10.1002/9781118987742.ch1
72. BALTAZAR, L. M. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. *Frontiers in microbiology*, v. 6, 2015.
73. TSAI, S. R. et al. Low-level light therapy potentiates NPe6-mediated photodynamic therapy in a human osteosarcoma cell line via increased ATP. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, v. 12, n. 1, p. 123-130, 2015.
74. ROSA, L. P. et al. Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy using a 660nm laser and methylene blue dye for inactivating *Staphylococcus aureus* biofilms in compact and cancellous bones: An in vitro study. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2015.
75. JIBLAOUI, A. et al. Novel polycarboxylate porphyrins: Synthesis, characterization, photophysical properties and preliminary antimicrobial study against Gram-positive bacteria. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 25, n. 2, p. 355-362, 2015.
76. AHN, Jin-Chul et al. Combination treatment with photodynamic therapy and curcumin induces mitochondria-dependent apoptosis in AMC-HN3 cells. *International journal of oncology*, v. 41, n. 6, p. 2184-2190, 2012.

77. LIANG, J. Y. et al. Investigations of blue light-induced reactive oxygen species from flavin mononucleotide on inactivation of *E. coli*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 143, p. 82-88, 2015.
78. PASCHOAL, M. A.; SANTOS-PINTO, L.; LIN, M.; DUARTE, S. Streptococcus mutans photoinactivation by combination of short exposure of broad-spectrum visible light and low concentrations of photosensitizers. *Photomedicine and laser surgery*, v. 32, n. 3, p. 175-180, 2014.
79. SIMON, C. et al. In vitro studies of different irradiation conditions for Photodynamic inactivation of *Helicobacter pylori*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 141, p. 113-118, 2014.
80. CIEPLIK, F. et al. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Frontiers in microbiology*, v. 5, 2014.
81. JEON, Y. M. et al. Antimicrobial photodynamic therapy using chlorin e6 with halogen light for acne bacteria-induced inflammation. *Life sciences*, v. 124, p. 56-63, 2015.
82. MAISCH, T. Strategies to optimize photosensitizers for photodynamic inactivation of bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2015.
83. NAKONIECZNA, J. et al. Photoinactivation of *Staphylococcus aureus* using protoporphyrin IX: the role of haem-regulated transporter HrtA. *Applied microbiology and biotechnology*, p. 1-13, 2015.
84. HANAKOVA, A. et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy on *S. aureus* and *E. coli* using porphyrin photosensitizers bound to cyclodextrin. *Microbiological research*, v. 169, n. 2, p. 163-170, 2014.
85. FU, XIU-JUN.; FANG, Y.; YAO, M. Antimicrobial photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Biomed research international*, 2013.
86. ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms, *Clin Endosc*, n. 46, p. 24-29, 2013.
87. BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy, *Biochim Biophys Acta*, n. 1776 p. 86-107, 2007.
88. GROSSWEINER, L. I. et al. Type I and type II mechanisms in the photosensitized lysis of phosphatidylcholine liposomes by hematoporphyrin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. v. 36, p. 159-167, 1982.
89. OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. v. 39, p. 1-18, 1997.
90. AGNEZ, L. L. F. et al. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 1, n. 751, p. 15-28, 2012.

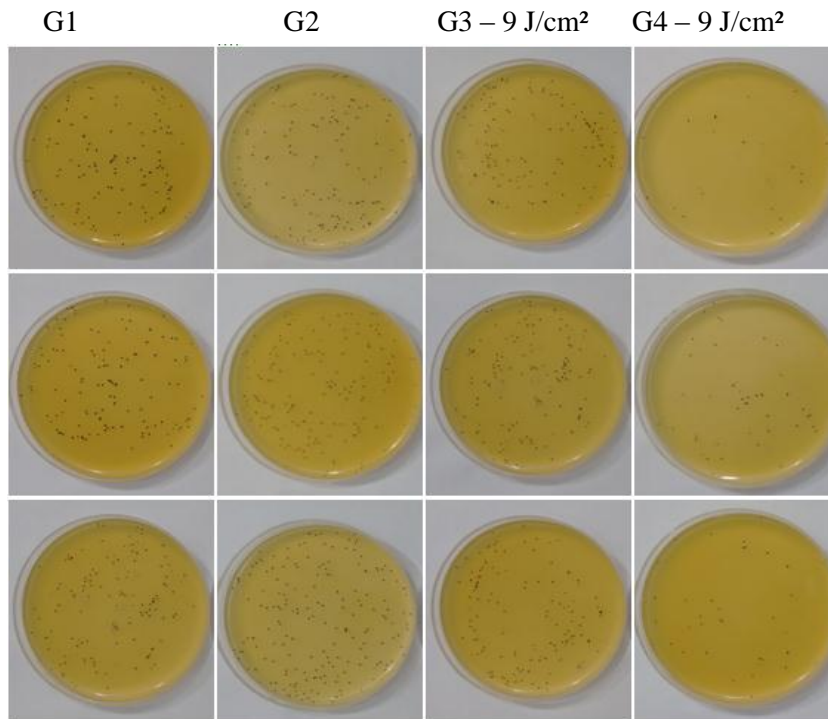
91. JUZENIENE, A.; PENG, Q.; MOAN, J. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis, *Photochem Photobiol Sci*, n. 6, p. 1234-1245, 2007.
92. BRACKMANN, U. In: *Lambdachrome Laser Dyes*, Lambda Physik, Gmbh, 1986.
93. BRASLAVSKY, S. E. Glossary of terms used in photochemistry, (IUPAC Recommendations 2006). *Pure and Applied Chemistry*, v. 79, n. 3, p. 293-465, 2007.
94. GORMAN, A. et al. In vitro demonstration of the heavy-atom effect for photodynamic therapy. *Journal of the American Chemical Society*, v. 126, n. 34, p. 10619-10631, 2004.
95. SIBATA, C. H. et al. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, n. 8, p. 869-880, 2000.
96. RIBEIRO, J. N. et al. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. *Eclética Química*, v. 32, n. 1, p. 7-14, 2007.
97. PALUMBO, G. Photodynamic therapy and cancer: a brief sightseeing tour, *Expert Opin Drug Deliv*, n. 4, p. 131-148, 2007.
98. SANABRIA, L. M. et al. Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment, *Biochim Biophys Acta*, n. 1835, p. 36-45, 2003.
99. JORI, G. et al. Photodynamic Therapy in the Treatment of Microbial Infections: Basic Principles and Perspective Applications. *Lasers Surg Med*, n. 38, p. 468-481, 2006.
100. WAINWRIGHT, M.; MOHR, H.; WALKER, W. H. Phenothiazinium derivatives for pathogen inactivation in blood products. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, n. 86, p. 45-58, 2007.
101. SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods in Enzymology*, n. 319, p. 376-400, 2000.
102. ALLISON, R. R. et al. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 1, p. 27-42, 2004.
103. PERVAIZ, S.; OLIVO, M. Frontiers in Research Review : Cutting-Edge, Molecular Approaches to Therapeutics. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, p. 551-556, 2006.
104. ZHAO, Y-G.; DING, W.; WEI, J. Preparation of a bis-demethoxy curcumin microemulsion based on pseudo-ternary phase diagrams and an orthogonal test analysis. *Journal of Pesticide Science*, v. 36, n. 2, p. 248-251, 2011.

105. PINTÃO, A. M.; SILVA, I. F. A verdade sobre o Açafrão. Workshop Plantas Medicinais e Fitoterapêuticas nos Trópicos. IICT /CCCM, 29, 30 e 31 de Outubro de 2008.
106. MATHAI, C. K. Variability in turmeric (*Curcuma* species) germplasm for essential oil and curcumin. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, v. 25, n. 3, p. 227-230, 1976.
107. RUSIG, O.; MARTINS M. C. Efeito da temperatura, do pH e da luz sobre extratos de oleoresina de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) e Curcumina. *Revista Brasileira de Corantes Naturais*, n. 1, p. 158-164, 1992.
108. FILHO, A. B. C.; et al. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. *Ciência Rural*, v. 30, n. 1, 2000.
109. SASIKUMAR, B. Genetic resources of *Curcuma*: diversity, characterization and utilization. *Plant Genetic Resources: characterization and utilization*, v. 3, n. 02, p. 230-251, 2005.
110. CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? *Braz J Infect Dis*, v. 9, n. 1, p. 70-6, 2005.
111. FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.
112. JAY, J. M. *Microbiologia moderna de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, 1994. 804p.
113. SMITH, J. L.; BUCHANAN, R. L.; PALUMBO, S. A. Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. *Journal of Food Protection®*, v. 46, n. 6, p. 545-555, 1983.
114. GORWITZ, R. J.; et al. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. *Journal of Infectious Diseases*, v. 197, n. 9, p. 1226-1234, 2008.
115. LEVINSON, W. *Microbiologia Médica e Imunologia*. 10ª edição. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010.
116. WALKER, T. S. *Microbiologia*. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2002.
117. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and Agricultural commodities production. Disponível em: < <http://faostat3.fao.org/home/S> >. Acessado em: 26 set. 2015.
118. OLIVEIRA, J. S. *Queijo: Fundamentos Tecnológicos*. São Paulo: Editora da UNICAMP, 1986.
119. AKERS, R. M. Lactation physiology: a ruminant animal perspective. *Protoplasma*, v. 159, n. 2-3, p. 96-111, 1990.

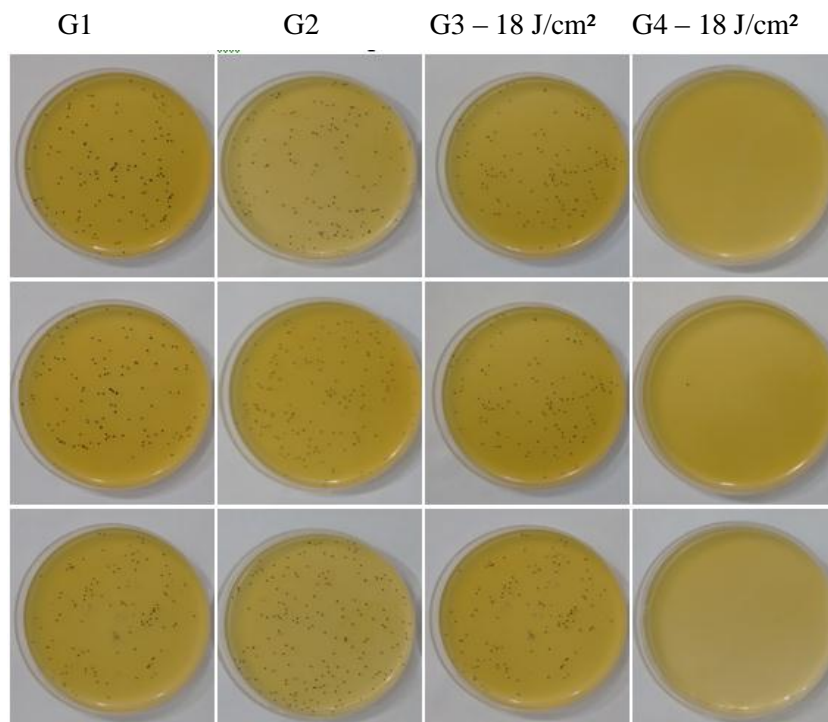
120. TRONCO, V. M. Aproveitamento do leite: elaboração de seus derivados na propriedade rural. Rio Grande do Sul: Livraria e editora agropecuária Ltda., 1996.
121. ZOCCAL, R. *O volume de leite de que precisamos*. v. 2, n. 2, p. 1, out. 2002.
122. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aperfeiçoamento e modernização da legislação sanitária federal sobre a produção de leite. Instrução Normativa no. 51, de 18/09/2002. Brasília, 2002.
123. BEHMER, A. M. L. *Tecnologia do leite*. São Paulo: Nobel, 1987.
124. GERMANO, P. E. L.; GERMANO, M. I. S. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimento, treinamento de recursos humanos. Barueri, SP: Manole, 2015. 5 ed. 1074 p.
125. HOFFMANN, F. L. Fatores limitantes à proliferação de microrganismos em alimentos. UNESP – São José do Rio Preto: BRASIL ALIMENTOS, 9ª ed. Julho/Agosto (2001).
126. CARMELLO, J. C. et al. Genotoxic effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on *Candida albicans*. *FEMS yeast research*, v. 15, n. 4, p. fov018, 2015.
127. WU, J. et al. Virucidal efficacy of treatment with photodynamically activated curcumin on murine norovirus bio-accumulated in oysters. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, v. 12, n. 3, p. 385-392, 2015.
128. MANOLOVA, Yana et al. The effect of the water on the curcumin tautomerism: a quantitative approach. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 132, p. 815-820, 2014.
129. SWANSON, K. M. J.; PETRAN, R. L.; HANLIN, J. H. Culture methods for enumeration of microorganisms. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4th ed. American Public Health Association, Washington, DC, p. 53-62, 2001.
130. LANCETTE, G. A.; BENNETT, R. W. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, v. 4, p. 387-403, 2001.
131. LUTZ, A. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. São Paulo: ANVISA, 2008.
132. JAKSON, Z. et al. Killing of the Yeast and Hyphal Forms of *Candida albicans* Using a Light-Activated Antimicrobial. *Agent. Lasers Med Sci*. v. 14, p. 150–157, 1999.
133. HEGGE, A. B. et al. Impact of curcumin supersaturation in antibacterial photodynamic therapy effect of cyclodextrin type and amount: studies on curcumin and curcuminoides XLV. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 101, n. 4, p. 1524-1537, 2012.

ANEXO 1**Imagens das placas de Petri – Leite Cru**

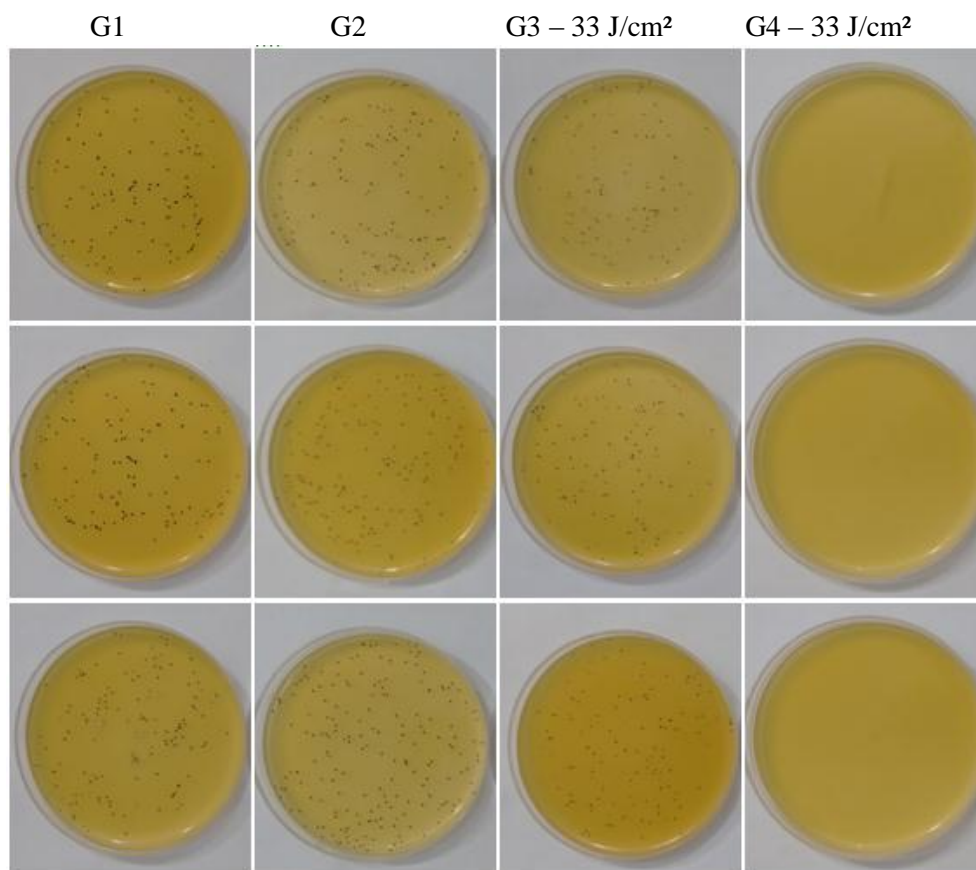
Concentração 750mg/L do Sal de Curcumina com as doses de luz 9, 18, 33, 54, 108 e 198 J/cm² para o leite cru.



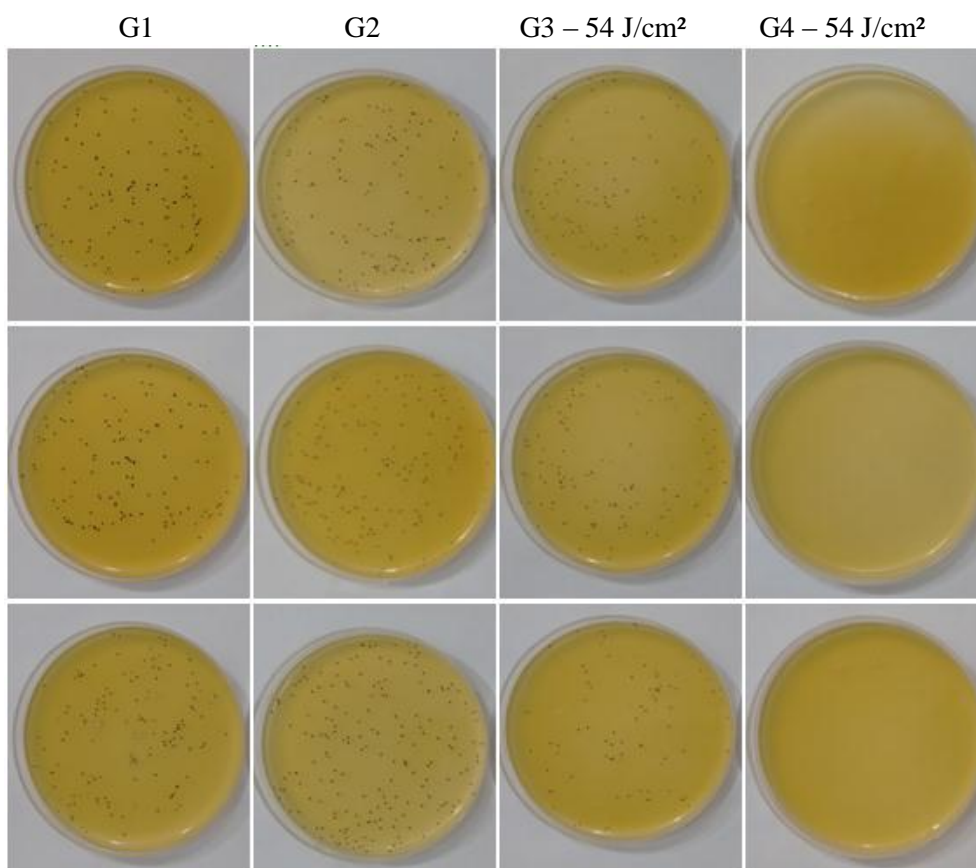
Fonte: Autor, 2015.



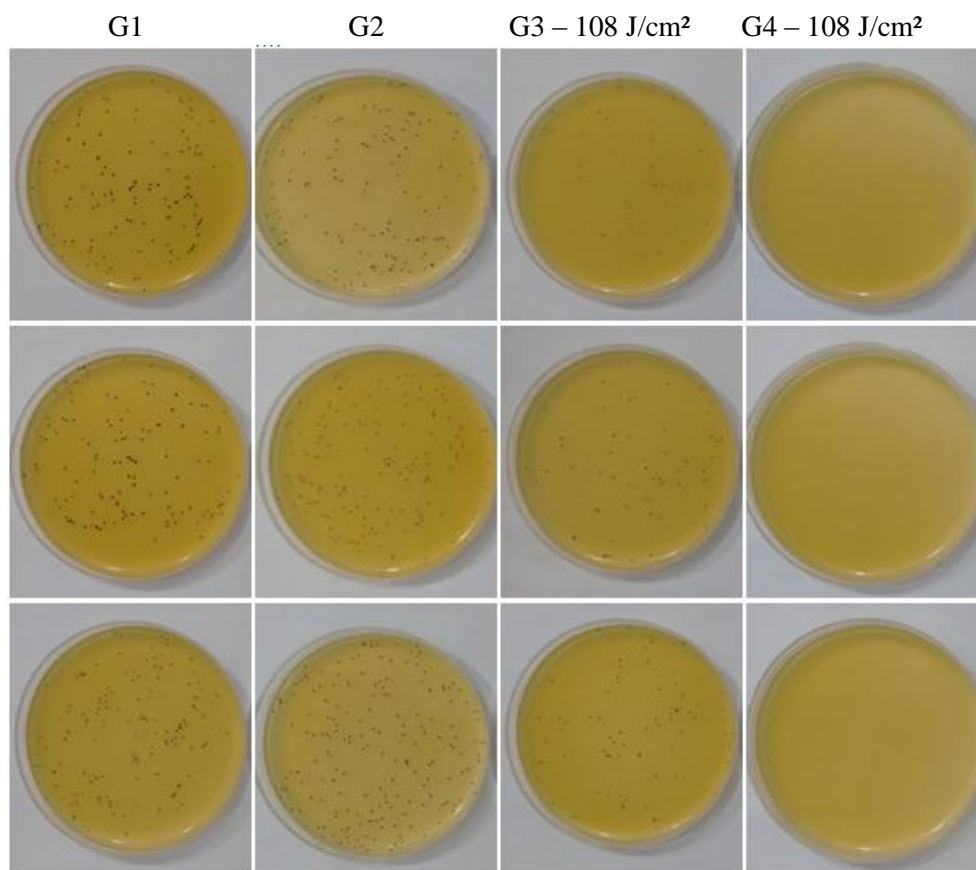
Fonte: Autor, 2015.



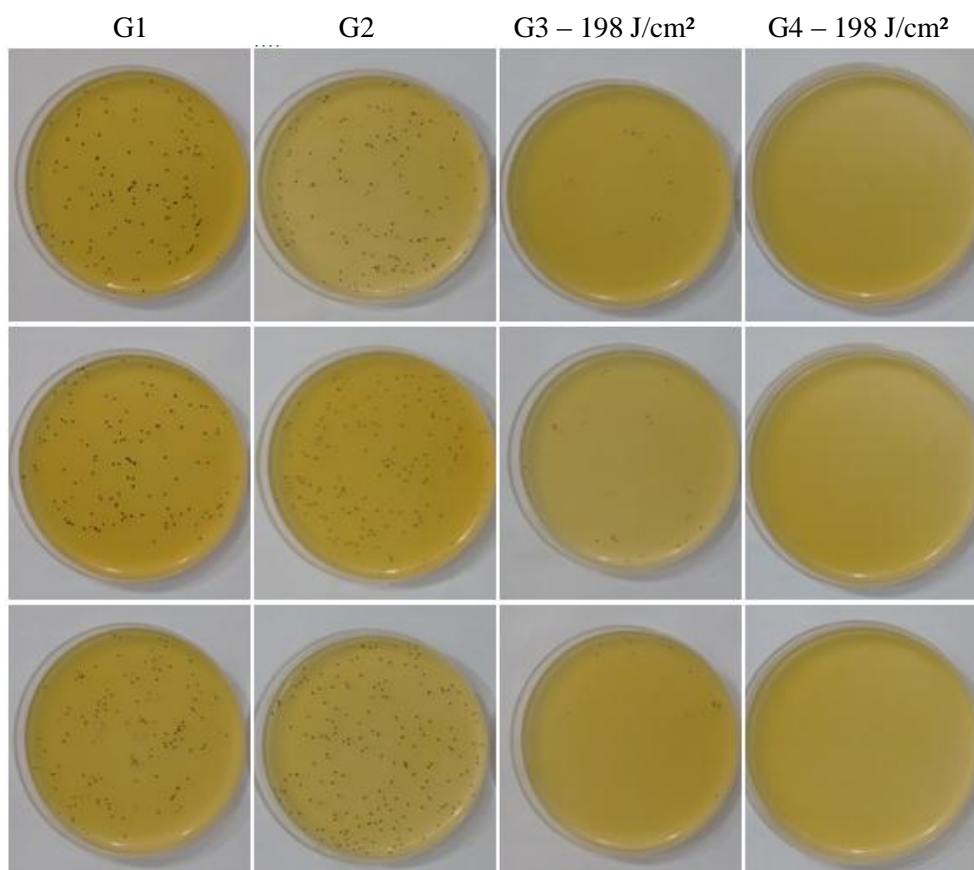
Fonte: Autor, 2015.



Fonte: Autor, 2015.



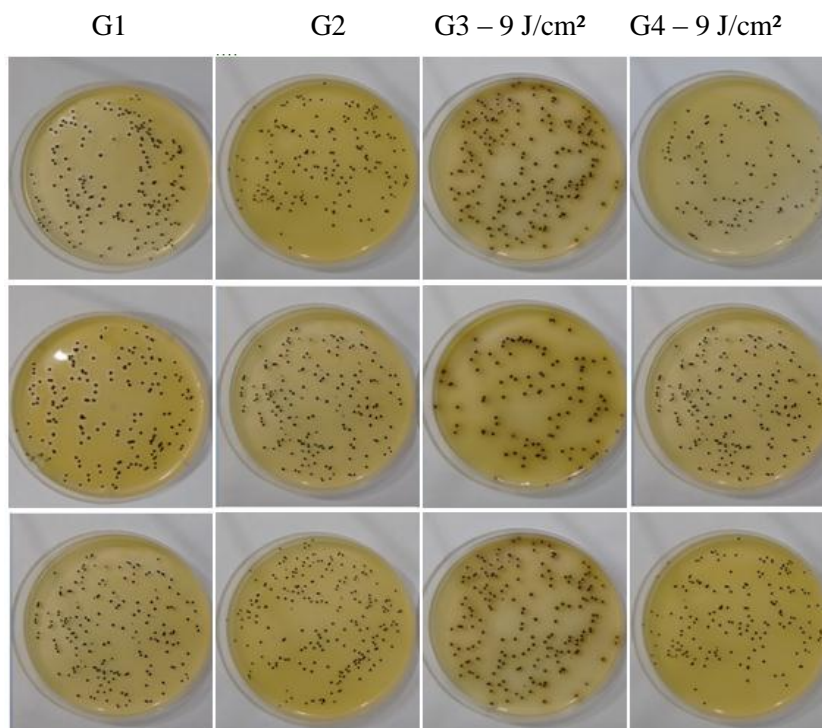
Fonte: Autor, 2015.



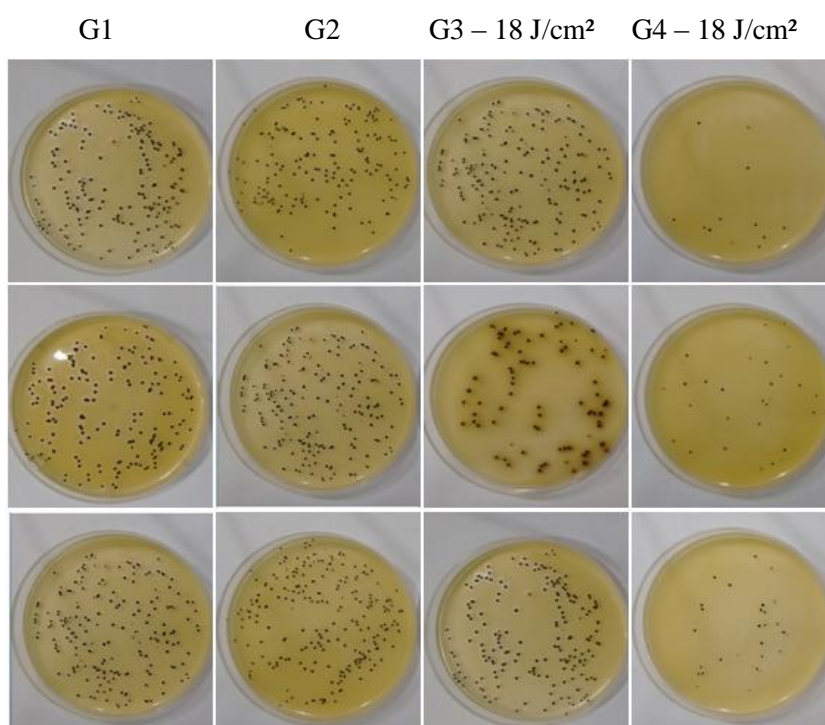
Fonte: Autor, 2015.

ANEXO 2**Imagens das placas de Petri – Leite Pasteurizado**

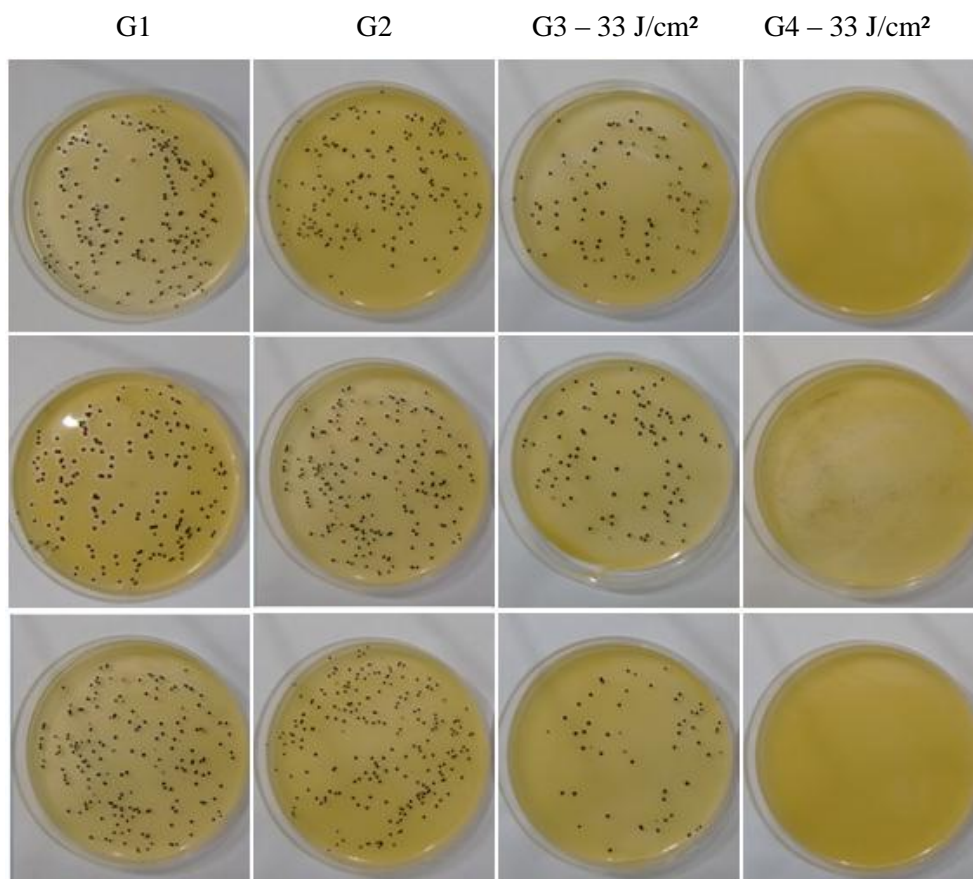
Concentração 750mg/L do Sal de Curcumina com as doses de luz 9, 18, 33, 54, 108 e 198 J/cm² para o leite pasteurizado.



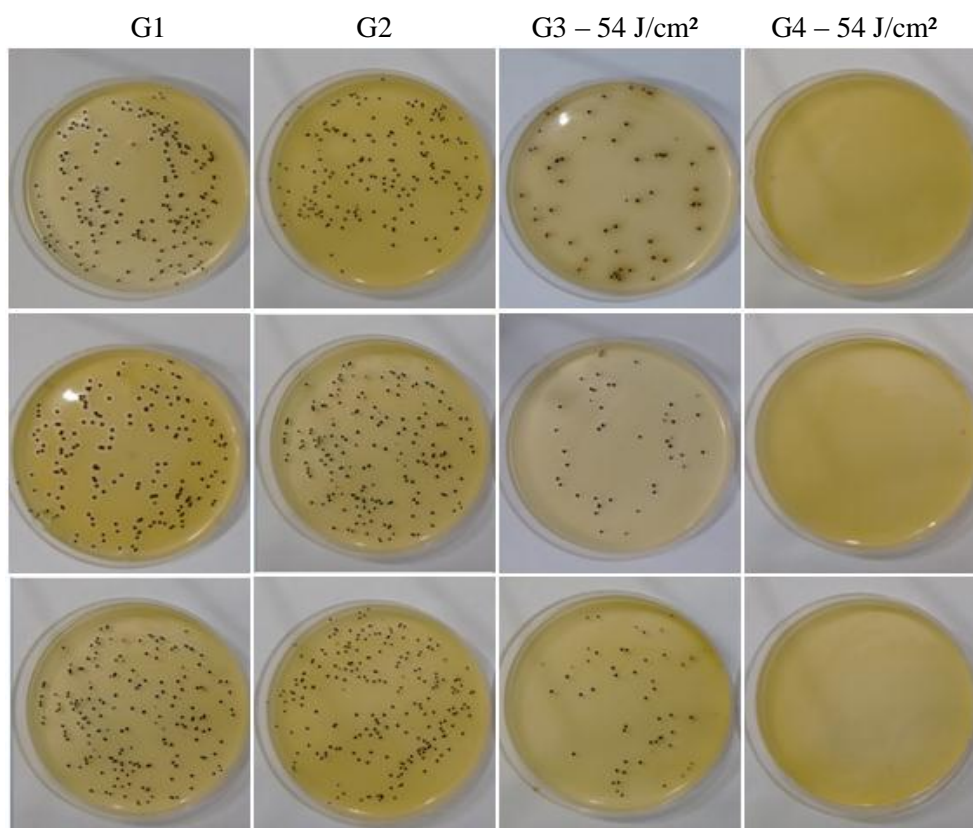
Fonte: Autor, 2015.



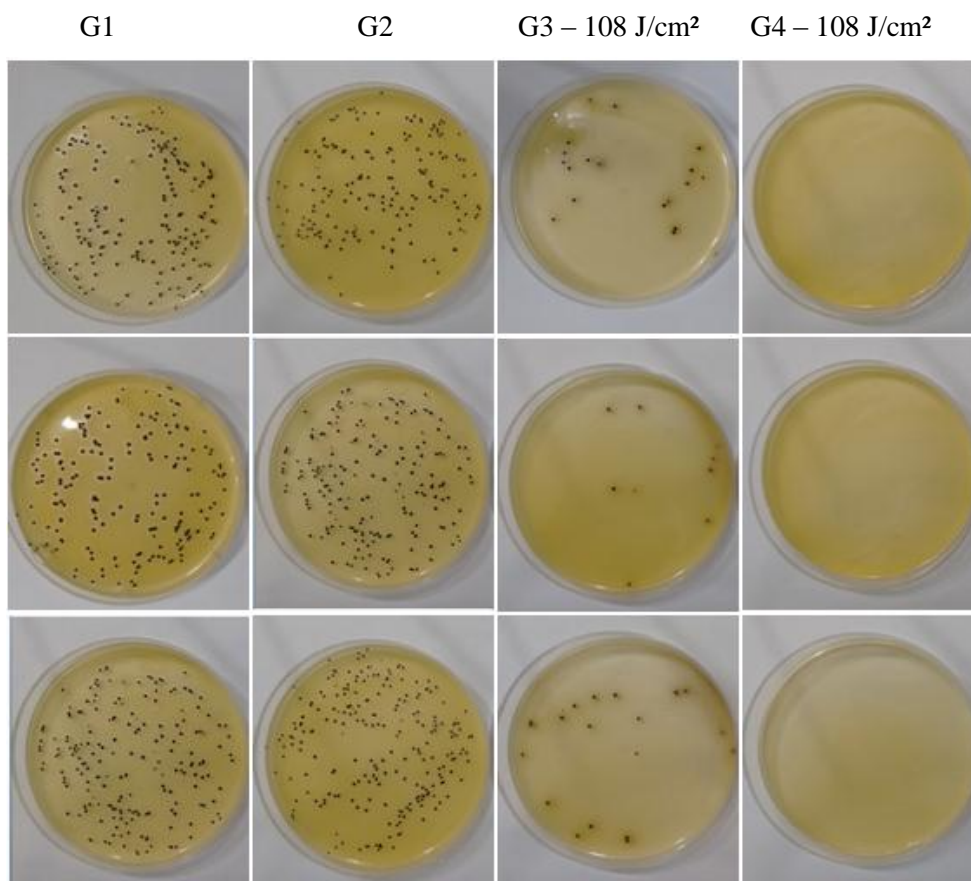
Fonte: Autor, 2015.



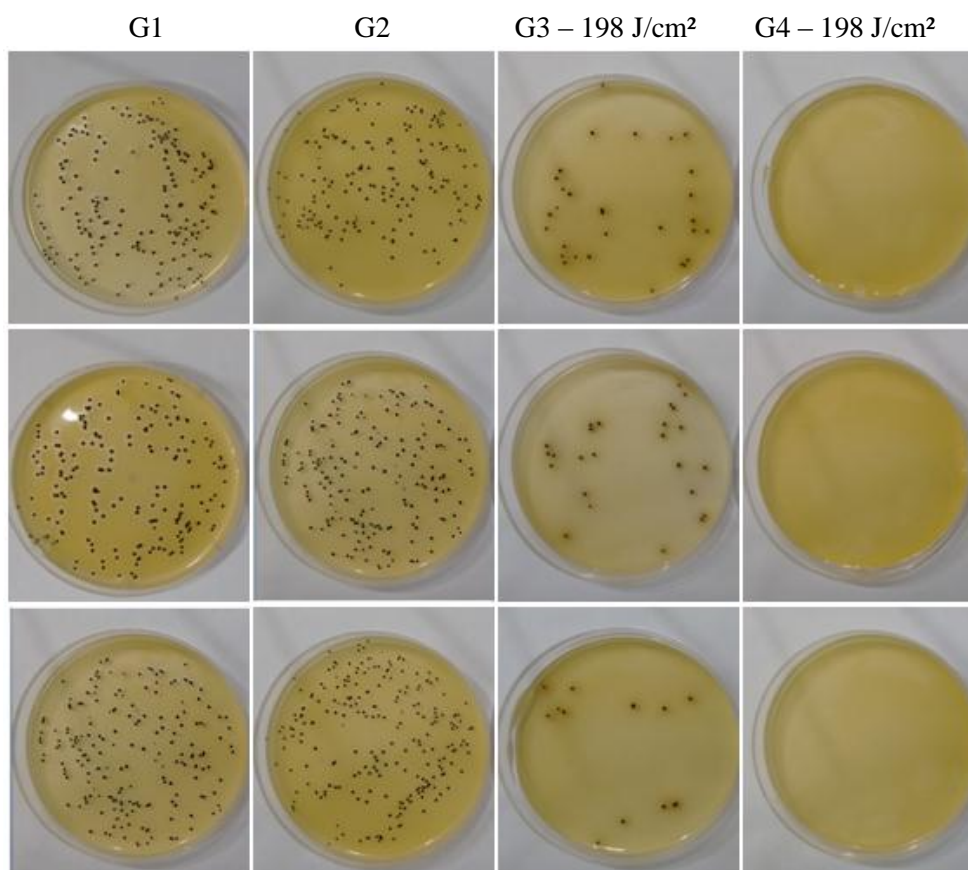
Fonte: Autor, 2015.



Fonte: Autor, 2015.



Fonte: Autor, 2015.



Fonte: Autor, 2015.