

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

**ROBENILSON FERREIRA DOS SANTOS**

**INVESTIGAÇÃO *IN VITRO* DE PARÂMETROS DA TERAPIA FOTODINÂMICA  
ANTIMICROBIANA APLICADA A *Staphylococcus aureus***

**Maceió- AL**

**2013**

**ROBENILSON FERREIRA DOS SANTOS**

**INVESTIGAÇÃO *IN VITRO* DE PARÂMETROS DA TERAPIA FOTODINÂMICA  
ANTIMICROBIANA APLICADA A *Staphylococcus aureus***

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Tereza de Araujo

**Maceió - AL**

**2013**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

S586i Santos, Robenilson Ferreira dos.  
Investigação *in vitro* de parâmetros da terapia fotodinâmica antimicrobiana aplicada a *Staphylococcus aureus*. – 2013.  
101 f. : il.

Orientadora: Maria Tereza de Araujo.  
Dissertação (mestrado em Física) – Universidade Federal de Alagoas.  
Instituto de Física. Maceió, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Inativação fotodinâmica. 2. Terapia fotodinâmica antimicrobiana.  
3. Terapia fotodinâmica. 4. Microrganismos. 5. *Staphylococcus aureus*.  
I. Título.

CDU: 53.43/.47



**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**

*"Investigação in vitro de Parâmetros da Terapia Fotodinâmica*  
*Antimicrobiana Aplicada a Staphylococcus aureus".*

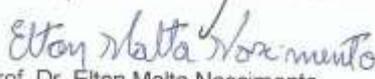
por

*Robenilson Ferreira dos Santos*

A Banca Examinadora composta pelos professores Maria Tereza de Araujo (orientadora), do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, Elton Malta Nascimento, Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, e Maria Cristina Delgado da Silva, da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas consideraram o candidato aprovado com grau "A".

Maceió, 22 de fevereiro de 2013

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Tereza de Araujo

  
Prof. Dr. Elton Malta Nascimento

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Cristina Delgado da Silva

**À minha querida mãe**

**Eulina Ramos Ferreira.**

**Para minhas irmãs:**

**Simone Ferreira e Silmara Ferreira.**

**E às minhas tias:**

**Maria Edna Ferreira e Roseli Ferreira.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu DEUS, por ter trilhado os meus caminhos e ter me dado conforto e paciência nos momentos mais turbulentos e imprecisos.

Aos meus pais por confiarem em minhas escolhas e por aceitarem as minhas decisões.

A minha orientadora, a professora Maria Tereza de Araujo por ter me acolhido como orientando e pelas discussões durante todo o trabalho. Muito obrigado por toda a paciência e confiança que a mim foram creditadas.

Ao Beliato Santana Campos, meu grande amigo e irmão, pelas discussões e por ter compartilhado momentos obscuros e alegres durante esses dois anos, assim como o apoio moral e confiança para a conclusão de mais uma etapa.

Ao professor Elton Malta e sua esposa Sybelle Malta, por ter dado suporte nos processos de instalação em Maceió e por terem se mostrado bastante próximos durante todo o curso.

Ao Francisco de Assis por ter nos acompanhado no laboratório de fotônica, nos ceder os sistemas de LED e se mostrar sempre disponível quando necessário.

A Núccia Carla, por ter nos apresentado os equipamentos do laboratório e ter paciência em responder os meus questionamentos referentes aos equipamentos e experimentos.

A Juliana de Oliveira Moraes (July) por se mostrar sempre disponível no laboratório de Nutrição e pelas ricas discussões que tivemos além de ter sido peça fundamental para as atividades na parte de microbiologia. Muito obrigado.

A Amália Luísa Ivo Albuquerque (Malu) que se mostrou sempre disponível no laboratório de Nutrição, mesmo com as suas atribuições de fim de curso. A sua colaboração também foi essencial para a realização deste trabalho. Muito obrigado.

A Professora Cristina Delgado, por ter fornecido o seu espaço de trabalho (Laboratório de Controle e Qualidade de Alimentos) para o desenvolvimento desta pesquisa e por sempre

se mostrar flexível às necessidades referentes a material e equipamentos. Sem ela nossos resultados não seriam alcançados. Muito obrigado.

Aos Professores Cristina Kurachi e Vanderlei Salvador Bagnato por nos ceder o Sal de Curcumina.

Ao Professor Pedro Valentim por ter contribuído para a minha formação acadêmica, mediante discussões relevantes a pesquisa.

Ao grupo de Fotônica e Fluidos Complexos (GFFC), do qual faço parte, pelas discussões e facilidades de infraestrutura usadas para desenvolver este trabalho.

Ao Instituto de Física da UFAL pela minha formação e espaço físico para desenvolver a pesquisa.

A Naiara Vieira, minha grande amiga, conterrânea e muitas vezes irmã. Muito obrigado pelo apoio e confiança a mim creditada. O seu contato via telefone e internet durante todo o curso tornou os meus dias mais felizes.

Ao Carlos Henrique, cearense brincalhão e alegre. Nossa amizade irá perdurar por muitos anos. Seu comprometimento e preocupação pela boa formação são notáveis. Muito obrigado por partilhar os bons momentos de trabalho e descontração.

Aos meus amigos: Adriano Santos, Maurício Brandão e Elisane Santos que se mostraram sempre presentes. As nossas ligações telefônicas encurtaram as distâncias. Obrigado por apostarem em mim desde os tempos de colégio.

Aos meus novos amigos: Paulo Borges, Job Saraiva, Wesley Queiroz, Ana Isabela, Andre Sechi, Flávia Ferreira Fernandes, Waléria Lopes, Zé Maria e Marlon Cuadros. Obrigado por ter conhecido vocês e ter tido boas relações de amizade e de trabalho.

Ao apoio financeiro através do projeto Pronex - NEXO

A CAPES pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A Terapia Fotodinâmica tem se desenvolvido principalmente para o tratamento anticâncer, porém, novas aplicações desta técnica têm se voltado contra a ação de microrganismos. Neste caso ela é denominada Inativação Fotodinâmica (PDI, do Inglês, *Photodynamic Inactivation*) ou, Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (em inglês, *Antimicrobial Photodynamic Therapy - aPDT*) e vem ganhando importância cada vez maior no tratamento de certas patologias. Ao longo do tempo foi verificado que algumas bactérias criavam resistência a certos antibióticos, o que é um problema grave, pois acarreta no aumento da dose do medicamento ou no uso associado com outras medidas para tentar combater a atuação do microrganismo. Uma importante vantagem da aPDT para o tratamento de infecções deve-se à possibilidade de inativação das cepas resistentes em comparação aos tratamentos convencionais. O mecanismo de ação da aPDT ocorre quando um determinado fotossensibilizador é excitado por uma fonte de luz em comprimento de onda ressonante a sua banda de absorção na presença de um substrato, como por exemplo, o oxigênio. É desencadeada então uma cadeia de reações que formam espécies químicas altamente reativas e de curto tempo de vida, como o oxigênio singleto e radicais livres, que podem provocar sérios danos aos microrganismos através da oxidação irreversível de componentes celulares. Tentando observar a inativação do *S. aureus* por meio da aPDT, tendo como fotossensibilizador o sal de Curcumina, foram testados protocolos experimentais que reproduzissem as condições ótimas que inviabilizam de forma mais efetiva o crescimento do microrganismo. O alimento testado para este trabalho foi o queijo coalho, que faz parte da dieta da população da região nordeste e pode ser muitas vezes um reservatório de proliferação desta bactéria. O experimento foi realizado em triplicata, *in vitro* e *in loco* sendo dividido em grupos de investigação. Foram usadas várias potências distintas, de forma a irradiar a amostra nos tempos de 5, 10, 20 e 30 min respectivamente com luz LED em 450 nm. As potências usadas foram 151 mW (P1), 204 mW (P2) e 258 mW (P3) e após escolhermos os dois melhores tempos para a inativação, as doses de luz utilizadas foram de 13 J/cm<sup>2</sup>; 16 J/cm<sup>2</sup>; 78 J/cm<sup>2</sup>; 98 J/cm<sup>2</sup>. Os resultados foram bastante expressivos para todas as doses testadas, obtendo uma inibição acima de 80 % quando comparado o grupo CONTROLE com o grupo PDT.

Palavras-chave: Inativação Fotodinâmica. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. Terapia Fotodinâmica. Microrganismos. *Staphylococcus aureus*.

## ABSTRACT

The Photodynamic Therapy has developed mainly for anticancer treatments, however, new applications of this technique are becoming devoted against the action of microorganisms. In this case it is termed as Photodynamic Inactivation (PDI) or Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) and is gaining growing importance on the treatment of certain pathologies. Over the past years it was found that some bacteria were creating resistance to certain antibiotics, which is a serious problem, as it leads to increasing applied doses of the drug or to associated use with other techniques to try to combat the microorganism action. In turn, an important advantage of aPDT for the treatment of infections is due to possibility of inactivating resistant strains in comparison to conventional treatments. The mechanism of action of aPDT occurs when a given photosensitizer is excited by a light source in a wavelength resonant to its absorption band in the presence of a substrate, such as oxygen. A reaction chain begins forming highly reactive chemical species with short life, such as singlet oxygen and free radicals, which can cause serious damage to microorganism due to the irreversible oxidation of cellular components. Trying to observe the inactivation of *Staphylococcus aureus* by means of aPDT, using a curcumin-based salt as the photosensitizer, experimental protocols, whose aim was to reproduce the optimal conditions which more prevented the growth of the microorganism, were tested. The tested food for this study was the rennet cheese, which is a component of the diet of the Northeastern Brazilian population and can be often a reservoir of proliferation for the bacteria. The experiment was performed in triplicate, *in vitro* and *in loco* being divided into experimental groups. It was used several different powers to irradiate the samples at times of 5, 10, 15, 20 and 30 min respectively with LED light at 450 nm. The powers used were of 151 mW (P1), 204 mW (P2) e 258 mW (P3), and after the best illumination times were chosen, the light doses used were of 13 j/cm<sup>2</sup>; 16 j/cm<sup>2</sup>; 78 j/cm<sup>2</sup>; 98 j/cm<sup>2</sup>. Very expressive results were obtained for all tested doses, attaining an inhibition above 80% when comparing the CONTROL group with the PDT group.

Keywords: Photodynamic Inactivation. Antimicrobial Photodynamic Therapy. Photodynamic Therapy. Microorganism. *Staphylococcus aureus*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Diagrama de Jablonski .....	21
Figura 2- Representação dos tipos de reação do FS com o substrato biológico .....	22
Figura 3- Espectro de absorção da <i>Curcuma Longa Linn</i> em diferentes solventes (água, etanol, glicerol e álcool polivinílico) .....	28
Figura 4- Fórmulas estruturais dos curcuminóides da Curcuma .....	29
Figura 5- Açafrão da Índia. ((a) planta e (b) rizoma) .....	29
Figura 6- Espectro de absorção do sal de Curcumina, onde observamos um deslocamento da banda de absorção para 350 nm .....	30
Figura 7- Conjunto de LEDs emitindo na região do azul (a) e (b) componentes de um LED .....	33
Figura 8- Comparação entre espectros de um laser e de um LED .....	34
Figura 9- Bactéria Gram (+) (a) e Bactéria Gram (-) (b) .....	35
Figura 10- (a) <i>Staphylococcus aureus</i> , no microscópio eletrônico e (b) usando a coloração de Gram .....	36
Figura 11- Reflexão de um feixe de luz por uma superfície plana .....	45
Figura 12- Refração de um feixe de luz se propagando do meio de origem (ar) para o meio de destino (água) .....	45
Figura 13- Janela Terapêutica da Melanina e Hemoglobina .....	48
Figura 14- Profundidade de penetração de comprimentos de ondas de luz laser usuais, em tecidos .....	49
Figura 15- Intensidade de espalhamento do espectro visível .....	50
Figura 16- Espalhamento de luz por um conjunto de partículas .....	51
Figura 17- Esquema de espalhamento geométrico .....	51
Figura 18- Esquema de espalhamento Rayleigh, mostrando que a luz é espalhada sem preferência de direção .....	52
Figura 19- Esquema de espalhamento Mie, mostrando que a direção de espalhamento preferencial é na direção de propagação da luz incidente .....	53

Figura 20- Exemplo de uma célula animal (a) e uma célula bacteriana (b).....	53
Figura 21- Esquema das principais interações da radiação com a matéria enfatizando a dose de luz aplicada .....	56
Figura 22- Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	63
Figura 23- Esquema dos passos para obtenção das diluições das bactérias .....	64
Figura 24- Concentrações do sal de Curcumina usadas no experimento .....	64
Figura 25- Placas de Petri e meio de Cultura Ágar Nutriente .....	65
Figura 26- Conjunto de <i>LEDs</i> emitindo em 450 nm irradiando proveta com bactérias	68
Figura 27- Estufa a 36 °C .....	66
Figura 28- Esquema do experimento com as placas de Petri .....	67
Figura 29- Procedimentos de análise. a) queijo coalho; b) Queijo emergido em Sal de Curcumina; c) Queijo em tubo de ensaio a ser exposto em luz de 450 nm .....	68
Figura 30- Esquema do experimento com as amostras de queijo de coalho .....	69
Figura 31- Esquema do experimento dos testes bioquímicos das amostras de queijo de coalho .....	70
Figura 32- Inativação do número de colônias de <i>S. aureus</i> dos grupos CUR e PDT como função da concentração do sal de Curcumina. O destaque é dado para a análise dos grupos CUR e PDT .....	71
Figura 33- Número de colônias de <i>S. aureus</i> dos grupos CONTROLE, LUZ, CUR e PDT como função da concentração do sal de Curcumina. O tempo de incidência de luz foi de 5 min .....	73
Figura 34- Número de colônias de bactérias dos grupos LUZ e PDT como função do tempo de irradiação das amostras .....	74
Figura 35- Porcentagem do n <sup>o</sup> de colônias de bactérias dos grupos LUZ-5min, LUZ-30min, PDT-5min e PDT-30min como função das potências incidentes nas amostras ...	74
Figura 36- Número de colônias de <i>S. aureus</i> presentes nos grupos de monitoramento (CON-TROLE, LUZ, CUR E PDT) para doses aplicadas de (a) 10 J/cm <sup>2</sup> , (b) 13 J/cm <sup>2</sup> e (c) 16 J/cm <sup>2</sup> . O gráfico (d) mostra um resumo dos resultados obtidos .....	75

Figura 37- Número de colônias de bactérias (em porcentagem (%)) como função da dose de luz aplicada ao grupo PDT. O destaque é dado para análise do grupo PDT, retirando-se o grupo CONTROLE .....	76
Figura 38- Placas de Petri dos grupos: CONTROLE, CUR, LUZ-5-P1, PDT-5-P1 .....	79
Figura 39- Número de colônias de bactérias comparando os grupos CONTROLE e PDT variando o tempo de entrega da luz (5, 10, 15, 20 e 30 min) e potência fixa de 151 mW. Em destaque as porcentagens de inativação de <i>S. aureus</i> .....	81
Figura 40- Número de colônias de bactérias comparando os grupos CONTROLE e LUZ variando o tempo exposição (5, 10, 15, 20 e 30 min) e potência fixa de 151 mW. Em destaque as porcentagens de inativação do <i>S. aureus</i> .....	82
Figura 41- Número de colônias de bactérias comparando os grupos CONTROLE e CUR. Em destaque a porcentagem de inativação do <i>S. aureus</i> .....	82
Figura 42- Resumo da inativação de <i>S. aureus</i> para todos os grupos investigados variando a dose de luz entregue ao meio biológico. O símbolo (*) na coluna LUZ-5-P2 indica bioestimulação e o (**) na coluna LUZ-30-P2 indica contaminação .....	83
Figura 43- Inativação de <i>S. aureus</i> para as doses de luz entregue ao meio biológico: 13 J/cm <sup>2</sup> , 17 J/cm <sup>2</sup> , 78 J/cm <sup>2</sup> e 98,5 J/cm <sup>2</sup> . Só para grupo LUZ (a) e só para grupo PDT (b). O símbolo (*) indica bioestimulação e o (**) indica contaminação .....	84
Figura 44- Comparativo das placas de petri dos grupos CONTROLE e PDT com relação à potência e dose de luz irradiada .....	84
Figura 45- Número médio de colônias típicas por amostra e grupo testado .....	85
Figura 46- Placas de Petri com as colônias de bactérias, submetidas aos testes bioquímicos. Grupos: a) QCNP-CONTROLE, b) QCNP-PDT-5, c) QCNP-PDT-30 .....	87
Figura 47- Placas de Petri com as colônias de bactérias, submetidas aos testes bioquímicos. Grupos: a) QCP-CONTROLE, b) QCP-PDT-5, c) QCP-PDT-30 .....	88

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Reações fotoquímicas entre o fotossensibilizador e o substrato biológico .....	21
Tabela 2- Efeitos citotóxicos causados às células microbianas .....	24
Tabela 3- Comprimento de onda máximo das bandas de absorção de fotossensibilizadores com aplicação em <i>aPDT</i> .....	27
Tabela 4- Lista de alguns <i>lasers</i> comumente usados, seus meios ativos e linhas de emissão .....	32
Tabela 5- Cinética de fotossensibilização (S: fotossensibilizador, RH: substrato com ligação-H, CAR: carotenóide). Modificada de Boulnois (1986) .....	57
Tabela 6- Doses, potências e tempos usados respectivamente .....	66
Tabela 7- Número de colônias de bactérias por grupo variando a dose de luz .....	77
Tabela 8- Número de colônias de <i>S. aureus</i> para cada grupo de monitoramento em UFC/mL .....	78
Tabela 9- Grupos testados e valor médio de suas respectivas colônias típicas .....	85
Tabela 10- Número de colônias de bactérias de <i>S. aureus</i> por grama (UFC/g), após testes bioquímicos .....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

TFD- Terapia Fotodinâmica

FS- Fotossensibilizador

PDT- *Photodynamic Therapy*

HpD- Derivados de Hematoporfirina

FDA- *Food and Drugs Administration*

ALA- ácido 5-aminolevulínico

PpIX- Protoporfirina-IX

PDI- *Photodynamic Inactivation*

aPDT- *Antimicrobial Photodynamic Therapy*

AIDS- Síndrome da imunodeficiência adquirida

HIV- vírus da imunodeficiência humana

ROS- *Reactive Oxygen Species*

nm-nanômetros ( $10^{-9}$  metros)

pH- Potencial de Hidrogênio

DMSO- dimetilsulfóxido

*S. aureus*- *Staphylococcus aureus*

*laser*- *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*

HILT- *High intensity laser treatment*

LILT- *Low Intensity Laser Therapy*

*LEDs- Light Emitting Diode*

UFC- Unidades Formadoras de Colônias

mm- milímetros ( $10^{-3}$  metros)

UV- Radiação Ultravioleta

ETR- equação do transporte radiativo

BP- Ágar *Baird- Parker*

BHI- *Brain Heart Infusion Broth*

APT- água peptonada tamponada

QCNP- Queijo Coalho Não Pasteurizado

QCP- Queijo Coalho Pasteurizado

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1 Terapia Fotodinâmica (TFD)</b> .....	<b>15</b>
<b>1.2 Histórico da Terapia Fotodinâmica</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana</b> .....	<b>18</b>
<b>1.4 Mecanismo de Ação da Terapia Fotodinâmica</b> .....	<b>19</b>
1.4.1 Reação do tipo I .....	22
1.4.2 Reação do tipo II .....	22
<b>1.5 Fotossensibilizador</b> .....	<b>25</b>
<b>1.6 A Curcumina (açafão-da-Índia-<i>cúrcuma longa L</i>) como fotossensibilizador para a TFD</b> .....	<b>28</b>
<b>1.7 Fontes de luz usadas para a TFD</b> .....	<b>31</b>
<b>1.8 <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	<b>34</b>
<b>1.9 Queijo de coalho</b> .....	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>38</b>
<b>2 INTERAÇÃO LUZ-MEIOS BIOLÓGICOS</b> .....	<b>44</b>
<b>2.1 Reflexão e Refração da onda eletromagnética</b> .....	<b>44</b>
<b>2.2 Absorção</b> .....	<b>46</b>
<b>2.3 Espalhamento</b> .....	<b>49</b>
<b>2.4 Meios Túrbidos</b> .....	<b>54</b>
<b>2.5 Interação fotoquímicas</b> .....	<b>55</b>
2.5.1 Bioestimulação .....	58
<b>2.6 Efeitos térmicos</b> .....	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>60</b>
<b>3 INATIVAÇÃO DE MICRORGANISMO VIA aPDT</b> .....	<b>62</b>
<b>3.1 Materiais e Métodos</b> .....	<b>62</b>
3.1.1 Análise <i>in vitro</i> .....	62
3.1.2 Análise <i>in loco</i> .....	67
3.1.2.1 Técnica de análise para <i>S. aureus</i> .....	67
<b>3.2 Maximizações dos Parâmetros: Concentração (FS), Potência (LED), Tempo de Irradiação (LED), Dose (LED), Diluição (<i>S. aureus</i>) e Meio de Cultura- Resultados e Análise</b> .....	<b>70</b>

<b>3.3 Ação da <i>aPDT</i> na inativação de <i>S. aureus</i> .....</b>	<b>76</b>
<b>3.4 Inativação de microrganismo via <i>aPDT in loco</i> .....</b>	<b>85</b>
<b>3.4.1 Análise dos resultados para <i>S. aureus</i> .....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>89</b>
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>94</b>

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 Terapia Fotodinâmica (TFD)**

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica empregada principalmente para o tratamento do câncer e tem ganhado cada vez mais destaque no cenário nacional e internacional por obter avanços no tratamento desta enfermidade. Para a efetivação da técnica é necessário o uso combinado de um corante, irradiação de luz em comprimento de onda específico por determinado tempo e substrato biológico. A luz será absorvida pelo corante levando-o a um estado excitado que por sua vez irá interagir com o oxigênio molecular formando oxigênio singlete altamente reativo, ou biomoléculas formando radicais livres que causarão danos às células doentes. A técnica também vem sendo testada em outras doenças não oncológicas e em microrganismos, neste caso ela é denominada de Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. A busca por novos mecanismos que objetivam a cura de enfermidades rondam a mente humana há muito tempo. O aprimoramento desses mecanismos é efetivado com o passar dos anos, com erros e acertos que culminam em observações importantes para os casos em estudo. Nessa perspectiva os conhecimentos gerados sobre a Terapia Fotodinâmica ao longo do tempo têm contribuído para o desenvolvimento da técnica seja com pesquisas de novos fotossensibilizadores (FS), novas fontes de luz, na dose de energia adequada e no tempo de exposição à irradiação, entre outros parâmetros que são importantes para a eficiência da ação fotodinâmica. Os principais tópicos relacionados à Terapia Fotodinâmica serão descritos a seguir, onde abordaremos um histórico do seu desenvolvimento, como também, mecanismos de ação e parâmetros que são de suma importância para o entendimento da TFD.

## **1.2 Histórico da Terapia Fotodinâmica**

Lutar contra as enfermidades do corpo não é um problema moderno, mas sim arduamente investigado desde as mais antigas civilizações, menos desenvolvidas ou mais isoladas. Desde os primórdios existiam pretensões em desenvolver técnicas, utilizando plantas e conhecimentos intrínsecos de cada civilização com o intuito de usá-las para o tratamento de certas doenças. Devido ao empenho nessa área, o uso de extratos vegetais no cuidado com a saúde do corpo, através de fármacos cada vez mais eficientes, se mostra efetivo até os dias atuais.

A Terapia Fotodinâmica propriamente dita não provém de tempos remotos, no entanto o uso da luz como terapia para o tratamento de certas patologias se remete a tempos antigos, desde que civilizações do antigo Egito, Índia e China já utilizavam a luz concomitantemente com extratos de plantas em certas doenças de pele [1, 2]. A Terapia Fotodinâmica (TFD), do inglês *Photodynamic Therapy* (PDT), é uma promissora modalidade de tratamento do câncer e outras doenças não oncológicas. Caracteriza-se por um conjunto de processos físicos, químicos e biológicos que ocorre após a administração de compostos fotossensibilizantes que apresentam maior afinidade por tecidos neoplásicos (doentes), seguido pela irradiação com luz visível [3, 4, 5]. A TFD é uma técnica que usa três ingredientes para a sua ação: um fotossensibilizador, uma fonte de luz e o substrato biológico.

Fazendo um apanhado cronológico da TFD, podemos começar citando Oscar Raab que em 1900 descreveu a ação do corante acridina e luz sobre o *Paramecium Caudatum* (protozoário causador da malária), demonstrando que este organismo unicelular pode morrer sob a ação da luz conjugada com uma substância que a absorve [6]. Este foi o primeiro caso de Terapia Fotodinâmica aplicado a um microrganismo, sendo observado o efeito citotóxico da utilização conjunta do corante com a luz.

Niels Rydberg Finsen, em 1901 [7] apontou que a radiação solar poderia ser utilizada na cura de *Lupus vulgaris*. Por sua vez, Von Tappeiner em 1903, com apenas decorridos três anos do primeiro surgimento da TFD descrito na literatura, usou o corante eosina e irradiação à luz em uma aplicação tópica para o tratamento de um tipo de câncer de pele [7,8]. Com o passar dos anos, as pesquisas foram avançando e, em 1913, é datada uma auto-injeção de 200 mg do que se pensava ser hematoporfirina pura por Meyer-Betz, no entanto ele não sentiu nenhum efeito dessa aplicação, entretanto ao ter se exposto à luz teve fotossensibilidade na pele por vários meses [1]. Já em 1924 Policard [1, 7, 10] com o objetivo de provocar efeitos fototóxicos em tecidos, com interesse principalmente em tumores malignos, se dedicou ao estudo das porfirinas.

A década de 50 foi marcada na história como o início da primeira geração de drogas fotossensibilizadoras à base de derivados de hematoporfirinas destinadas ao uso em TFD, tendo como precursor o pesquisador Sam Schwartz [1, 7]. Ele mostrou que nos experimentos de Meyer-Betz, o princípio ativo não era a hematoporfirina, pois esse composto é facilmente eliminado do organismo, mas na realidade tratava-se de uma mistura de diversas substâncias oligoméricas provenientes do método original de síntese e isolamento da mesma. Sam

Schwartz enriqueceu a mistura de oligômeros (chamou o preparado de hematoporfirina D) e R. L. Lipson, sob orientação de Schwartz na década de 60, investigou o acúmulo preferencial deles em tumores implantados em camundongos e ratos e observou que a incidência de luz proporcionava regressão da doença [1,11].

O início da TFD como terapia clínica destinada ao câncer, só foi registrada no final da década de 60, quando Lipson ao tratar uma mulher com câncer de mama obteve resultados satisfatórios no tratamento com derivados de Hematoporfirina (HpD) e irradiação seletiva [11]. Posteriormente, preparações de derivados porfirínicos foram testados para o uso em TFD a partir da década de 70, levando ao desenvolvimento do Photofrin II<sup>®</sup> (refinamento do HpD) por Dougherty [12]. No fim da década de 80, a empresa QLT Inc. através de purificações e otimizações do preparado anterior, *via* processos de liofilização, chegou ao medicamento Photofrin (no ano de 2000, a QLT vendeu a marca do seu produto para a Axcan Scandipharm Inc) que teve a sua liberação para uso em tratamentos de tumores em 1998 [13] e foi o primeiro fotossensibilizador aprovado pelo FDA (*Food and Drugs Administration*, USA) para essa ação [9]. O empenho por melhorias nas propriedades fotofísicas em relação ao Photofrin<sup>®</sup> e a busca por novas drogas fotossensíveis, foram o marco para a segunda geração de fotossensibilizadores. Essa empreitada levou em 2000 à aprovação do Visudyne<sup>®</sup> pela USA/FDA, usado para o tratamento de degeneração macular da retina e que também está sendo testado pela QLT e University of British Columbia (UBC) na terapia do câncer, AIDS e outras patologias [14].

Em 1990 Kenedy et al, deram novo impulso à TFD com a introdução do ácido 5-aminolevulínico (ALA) e seus ésteres, substâncias precursoras da protoporfirina-IX, que é uma porfirina endógena. Este, quando administrado de forma exógena, age como uma pré-droga, induzindo a formação de porfirina endógena (PpIX). A administração do ALA pode ser tópica, veiculada em cremes ou pomadas, ou administração oral [15, 16].

Com o passar do tempo, novos fotossensibilizadores foram sendo descobertos e testados e, só a partir da década 90, é que a utilização da TFD em microrganismos teve um recomeço.

### 1.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (*aPDT* ou *PDI*)

A Terapia Fotodinâmica tem se desenvolvido principalmente para o tratamento de câncer, no entanto novos avanços desta técnica têm a tornado útil para ser usada contra a ação de microrganismos [4, 17, 18], neste caso ela é denominada como Inativação Fotodinâmica (PDI, do Inglês, *Photodynamic Inactivation*) ou, Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (em inglês, *Antimicrobial Photodynamic Therapy - aPDT*) e vem ganhando cada vez mais espaço para o tratamento de certas patologias de origem microbiana, viral, inflamatória e fúngica [4, 19]. Uma gama de trabalhos está sendo desenvolvido de forma crescente neste campo, pois esta técnica tem revelado resultados satisfatórios na redução de microrganismos orais humanos *in vitro* e *in vivo*, tornando-se uma opção complementar para inibição microbiana com potencial patogênico [11,13, 20, 21, 22, 23,24, 25, 26].

O primeiro uso da *aPDT* da literatura se remete às investigações, citadas anteriormente neste texto, em 1900 por Oscar Raab que publicou um artigo o qual descrevia os efeitos fotodinâmicos no microrganismo unicelular conhecido como *Paramecium caudatum*, quando este era submetido ao corante acridina juntamente com luz ocasionando na morte desse organismo. Em 1904, Von Tappeiner criou o termo “reação fotodinâmica” [27].

Com o advento dos antibióticos a *aPDT* ficou em um estado de inércia, por certo período. No entanto, ao longo do tempo foi verificado que certas bactérias estavam criando resistência a alguns antibióticos, acarretando em um grave problema, pois era necessário medidas como o aumento da dose do medicamento ou o uso associado com outros protocolos para tentar combater a atuação dos microrganismos. Essa resistência foi um aspecto negativo na evolução da terapêutica antimicrobiana, destacando-se alguns fatores que podem ser indicados como causadores dessa resistência, tais como a prescrição indiscriminada desses antibióticos pelos profissionais de saúde, automedicação, a conservação de carne e cultivo de vegetais em estufa. Dessa forma, muitos pesquisadores foram estimulados a desenvolver técnicas alternativas ao uso dos fármacos [19, 28, 29].

Assim é possível destacar que o retorno da aplicação antimicrobiana da TFD na década de 90 foi resultado principalmente do enorme crescimento da resistência bacteriana aos fármacos e dois eventos culminaram com este retorno que foi a disseminação da AIDS devido ao HIV e o enorme crescimento das infecções hospitalares devido às multiplicações das bactérias resistentes nesses ambientes [15]. Nos últimos anos foi publicado um grande

número de estudos, que descrevem a morte de bactérias periodontopatogênicas através de métodos fotodinâmicos [20, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36], objetivando a introdução dos métodos fotodinâmicos para o tratamento de doenças periondontais.

Muito antes da Segunda Guerra Mundial foi demonstrada a aplicabilidade dessa técnica em bactérias, vírus e protozoários, mas foi esquecida devido à popularização do emprego dos antibióticos [15]. Entretanto a razão que limita a utilização dos antibióticos é o fato das drogas convencionais apresentarem um único sítio e modo de ação. Após determinada exposição, a maioria dos micróbios são capazes de desenvolver mecanismos resistentes para um único ponto de ataque. Fato este que não ocorre com os fotossensibilizadores, pois eles têm a sua ação via produção de oxigênio singlete ou espécies reativas de oxigênio, os quais não apresentam uma especificidade com relação ao alvo biomolecular, reagindo rapidamente com uma variedade de substratos incluindo o colesterol, as acilas insaturadas das camadas lipídicas das membranas, a histidina e o triptofano das proteínas. Dessa forma a fotoinativação poderá provocar danos nas biomoléculas que conduzirão à perda da funcionalidade biológica apropriada, levando à inativação da célula. Assim não existe resistência microbiana natural à *aPDT*, não sendo relevante se a cepa é resistente a uma ou muitas classes de agentes antibacterianos [15, 37].

Logo, uma característica particular desta técnica é o fato de ser difícil criar resistência por parte das bactérias, pois neste caso não haverá apenas um sítio alvo, mas sim, a ação da reação resultante será ocasionada em várias partes da célula, não tendo dessa forma um único local de atuação. Temos também que os hidroperóxidos resultantes podem levar à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS do inglês *reactive oxygen species*) facilitadas pelas peroxidases. Uma vez que a reatividade das ROS com moléculas orgânicas não é específica, qualquer macromolécula dentro da célula pode ser um alvo em potencial para a *aPDT*. Esta multiplicidade de alvos dificulta o desenvolvimento de resistências, por parte das células, contra este procedimento terapêutico [15].

#### **1.4 Mecanismo de Ação da Terapia Fotodinâmica**

O mecanismo de ação da TFD baseia-se na administração tópica ou sistêmica de uma substância não tóxica e sensível à luz, denominada de fotossensibilizador (FS), que em seguida é irradiada em baixas doses com luz visível de comprimento de onda na região de absorção da substância em questão [3, 5]. Assim, quando o FS é irradiado, este no estado

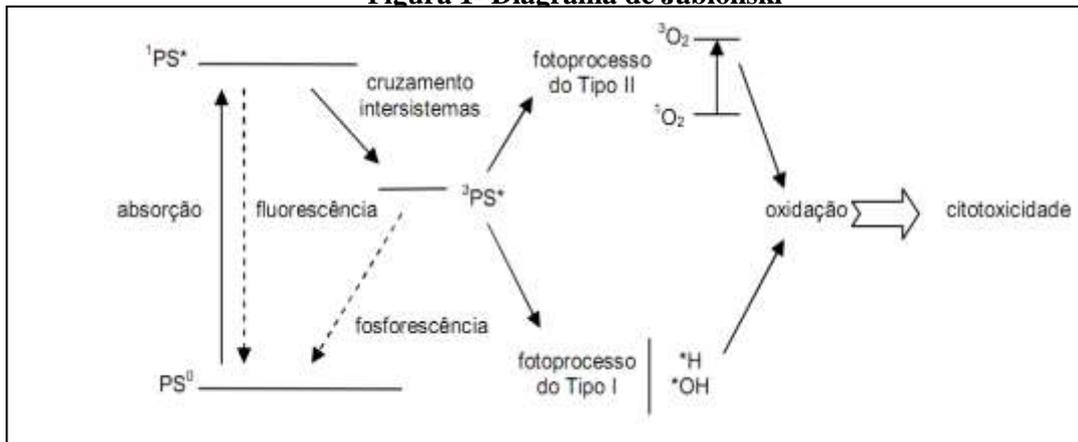
fundamental ( $S_0$ ) absorve fótons da fonte de luz e seus elétrons passam para o estado excitado singlete ( $S_1$ ), indo para um nível eletrônico de maior energia. Dessa forma, uma vez no estado excitado, o FS pode retornar ao seu estado fundamental por via de dois processos: radiativos (fluorescência ou fosforescência) ou não radiativos (conversão interna, cruzamento intersistema ou relaxações vibracionais), descritos na Figura 1. O processo de decaimento energético mais interessante para a TFD é o cruzamento intersistema, pois este permite que o FS no estado excitado ( $S_1$ ) sofra uma transição proibida por spin, para o estado excitado tripleto ( $T_1$ ), além do que, o FS no estado excitado tripleto ( $T_1$ ) apresenta um tempo de vida maior que o estado excitado singlete, por conta da transição  $T_1 \rightarrow S_0$  ser proibida por spin, e na presença de um substrato biológico, como por exemplo, o oxigênio, o FS ao retornar do estado  $T_1$  para o estado  $S_0$  transfere energia ao substrato, formando espécies químicas reativas que podem causar danos às células [2, 7, 19, 20, 37, 38].

O FS excitado pode reagir com moléculas na sua vizinhança por transferência de elétrons ou hidrogênio levando à produção de radicais livres (reação do tipo I) ou por transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), levando à produção de oxigênio singlete, como descritas nas Figuras 1 e 2. Ambos os caminhos podem levar à morte celular e à destruição do tecido doente [2, 7, 15, 38, 39]. O Oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) é uma espécie química capaz de reagir com quase todos os componentes celulares, uma vez que os compostos orgânicos insaturados são geralmente suscetíveis à ação desses. Entretanto, se as reações de sensibilização ocorrer na região extracelular, os lipídeos insaturados da membrana celular sofrerão oxidações, podendo comprometer a viabilidade das células. Os hidroperóxidos resultantes podem levar à formação de espécies reativas de oxigênio facilitadas pelas peroxidases. Uma vez que a reatividade das ROS com moléculas orgânicas não é especificada, qualquer macromolécula dentro da célula pode ser um alvo em potencial para a TFD. Esta multiplicidade de alvos dificulta o desenvolvimento de resistências por parte das células [5, 15].

A *aPDT* em questão, é iniciada quando a molécula do FS, une-se à célula-alvo, neste caso ao microrganismo, ou mesmo chegue a ultrapassar a barreira da membrana celular, localizando-se no citoplasma da célula num tempo de 1 a 10 minutos. É importante ressaltar, que segundo Jakson et al. [40], observa-se que o uso de concentrações mais elevadas de FS pode provocar menores efeitos fotodinâmicos, uma vez que os sítios de ligação do composto com as células tornam-se saturados. Outra questão a ser levada em consideração é o fato que o

FS não sofra degradação durante esse período, antes da ativação pela fonte de luz [41], o que se torna uma importante característica, pois tornará o processo de inativação mais eficiente. Logo é importante destacar que os FSs, devem seguir uma série de características necessárias para o tratamento fotodinâmico, e dentre elas, os compostos utilizados devem possuir toxicidade baixa no escuro e tendência elevada a acumular-se nas células alvo, evitando-se que a vizinhança acidentalmente iluminada seja danificada [42]. Um requisito importante, na fotossensibilização letal, é que o tempo de vida útil do substrato excitado seja suficiente para permitir a interação com as moléculas vizinhas para, assim, produzir espécies citotóxicas [7, 39, 42].

**Figura 1- Diagrama de Jablonski**



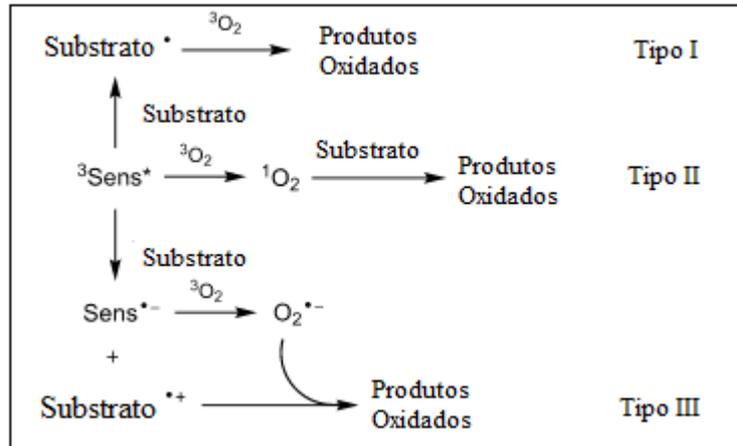
Fonte: Adaptado de BAGNATO, V. S, 2008 [15].

**Tabela 1- Reações fotoquímicas entre o fotossensibilizador e o substrato biológico.**

Excitação		Decaimentos	
${}^1S + hv = {}^1S^*$		${}^1S^* \Rightarrow {}^3S^*$	
Reação Tipo I	Reação Tipo II	Reação Tipo III	
${}^3S^* + B \Rightarrow {}^1S + B^*$	${}^3S^* + {}^3O_2 \Rightarrow {}^1S + {}^1O_2^*$	${}^3S^* + B \Rightarrow {}^3S^+ + B^-$	

Fonte: Adaptado de NIEMZ, 2003 [43].

**Figura 2- Representação dos tipos de reação do FS com o substrato biológico.**



Fonte: Adaptado do NIEMZ, 2003 [43].

#### 1.4.1 Reação do tipo I

O fotossensibilizador no estado excitado pode agir removendo um átomo de hidrogênio de uma molécula do substrato biológico (fosfolipídios, proteínas, colesterol entre outros) ou transferindo elétrons, gerando íons radicais que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental resultando em produtos oxidados responsáveis pela cadeia de radicais livres gerados, como radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), e radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), capazes de oxidar uma grande variedade de biomoléculas [7, 15].

A participação desse processo para os fotossensibilizadores atualmente usados em terapia fotodinâmica não ultrapassa 10% dos efeitos totais. Porém, pode haver variações desta porcentagem, dependendo das características do fotossensibilizador como da natureza da célula sensibilizada [26, 44].

#### 1.4.2 Reação do tipo II

A reação do tipo II é iniciada, quando o FS no estado excitado singleto decai para o estado excitado tripleto, por meio do cruzamento intersistema. Assim o FS, neste estado (tripleto), pode transferir energia ao oxigênio molecular no estado fundamental (tripleto), via um processo de transferência de energia durante uma colisão, produzindo oxigênio singleto. O oxigênio singleto é uma forma altamente reativa de oxigênio e é considerado o principal mediador do dano fotoquímico causado à célula por muitos fotossensibilizadores. O oxigênio singleto possui tempo de vida em água de aproximadamente 4  $\mu\text{s}$  e em sistemas biológicos esse tempo é extremamente baixo, inferior a 0,04  $\mu\text{s}$ . Em função disso, seu raio de ação é

extremamente reduzido ( $< 0,02 \mu\text{m}$ ), atuando apenas onde é produzido, fato muito importante para a PDT que se baseia no efeito fotodinâmico localizado [7,15, 39].

Segundo a literatura há uma competição entre os dois mecanismos de ação, bem como, os produtos originados de cada reação apresentam-se diferentes. Entretanto, parâmetros como o fotossensibilizador, o substrato, a concentração de oxigênio presente, assim como a ligação do FS ao substrato, podem influenciar na proporção de formação desses dois processos (reação tipo I e reação tipo II) que podem ocorrer simultaneamente. Por outro lado ao comparar as constantes de velocidade dos mecanismos de transferência de energia (constante de velocidade em torno de  $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) com a constante de velocidade de transferência de carga (usualmente abaixo de  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), pode-se dizer que a energia transferida para outros compostos que possam competir com o oxigênio deve ser de menor importância e o mecanismo do tipo II, é o comumente dominante [15].

A eficiência do processo fotodinâmico aumenta quando o rendimento quântico, o tempo de vida do estado tripleto do fotossensibilizador e do estado singleto do oxigênio ( $^1\text{O}_2$ ), aumentam. O rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_f$ ) pode ser definido como a razão entre o número de fótons emitidos por fluorescência e o número total de fótons absorvidos, ou seja, de moléculas excitadas. O rendimento quântico ( $\Phi$ ) pode também ser analisado pela razão entre o número de partículas danificadas pelo número de fótons absorvidos [44, 45].

Para Wainwright [19] a estrutura molecular dos FS, assim como a sua localização no meio onde está ocorrendo à transferência de energia, influencia no mecanismo de reação. Dessa forma, a depender da localização do FS e do meio, este pode provocar diferentes ações citotóxicas que estão descritas na Tabela 2 a seguir.

**Tabela 2- Efeitos citotóxicos causados às células microbianas.**

Sítio de ação	Ação	Resultado	Conseqüência	Evento Citotóxico
Água	Abstração de hidrogênio	Formação de radical hidroxil (HO)	Formação de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	Processos oxidativos adicionais.
Lipídios insaturados e esteróides na membrana ou na parede celular	Peroxidação	Peroxidação	Formação de hidroperóxido	Aumento na permeabilidade iônica (saída de Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )
Peptídeo	Abstração de hidrogênio	Ligação cruzada de peptídeos	Inativação enzimática	Perda da capacidade de reparo; lise
Capsídeo viral	Oxidação de resíduos de Tir/Met/His	Degradação de proteína		Perda de patogenicidade
Cadeia respiratória	Reações redox			Inibição de respiração
Enzimas citoplasmáticas e virais (por ex. transcriptase reversa)	Oxidação ou ligação cruzada			Inibição de montagem do ribossomo; inibição da replicação/patogenicidade
Resíduos de ADN (DNA) (tipicamente guanosina)	Oxidação da base ou açúcar.	8-hidroxi-guanosina	Degradação do nucleotídeo; degradação/quebra de açúcar.	Substituição da base; quebra da fita; mutação; inibição de replicação

Fonte: WAINWRIGHT, 1998 [19].

Uma das vantagens da *aPDT* é o fato da aplicação tópica do fotossensibilizador na área infectada que possibilita que essa substância entre em contato diretamente com o micróbio sem ser distribuída às células do hospedeiro. Dessa forma há certa seletividade, pois o fotossensibilizador se liga mais rapidamente aos micróbios e mais lentamente às células do hospedeiro. Assim, se a luz é aplicada relativamente rápida após a administração do fotossensibilizador, o dano colateral para o tecido hospedeiro será minimizado.

Para a terapia fotodinâmica um dos ingredientes fundamentais é a dose de luz aplicada, logo é necessário conhecer o comprimento de onda ( $\lambda$ ) geralmente dado em nanômetros, o regime de operação da luz (contínua ou pulsada), o tempo de irradiação (dado

em segundos), a fluência/dose (ou densidade de energia) e a taxa de fluência/Intensidade (ou irradiância). Dessa forma a fluência ou dose, que é dada por  $J/cm^2$ , também conhecida como densidade de energia, é calculada como:

$$D = \frac{P \cdot \Delta t}{A} \quad (1.1)$$

onde temos que  $P$  é a potência dada  $J/s$  (ou  $W$ ),  $\Delta t$  é o intervalo de tempo dado em  $s$  e  $A$  é a área dada em  $cm^2$ . A taxa de fluência ( $I$ ), expressa em  $W/cm^2$ , também conhecida como intensidade ou densidade de potência é calculada usando a equação (1.2) [7, 15, 43].

$$I = \frac{P}{A} \quad (1.2)$$

Para Niemz [43] há uma conhecida região espectral no intervalo de 600 a 1000 nm, chamada de “Janela terapêutica”, que é comumente usada nas áreas biomédicas por apresentar uma boa transparência às células do tecido humano, tendo também boa penetração da luz na pele e nas mucosas, com risco mínimo de destruição das células sadias que não possuem o FS. Por outro lado, é importante que a dose de luz seja corretamente calculada respeitando os limites dessa “Janela” para uma melhor eficiência do tratamento fotodinâmico, assim como, para evitar que células sadias absorvam a luz irradiada. A dose de luz é aplicada de modo regular e gradual, de maneira que doses baixas ou altas podem não produzir os efeitos desejados ou gerar prejuízos. É necessário um nível mínimo de energia para que as reações sejam ativadas. 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, interações fotoquímicas entre outros.

## 1.5 Fotossensibilizador

Os fotossensibilizadores (FS) são substâncias sensíveis à luz e de fundamental importância para a ação da Terapia Fotodinâmica, pois apresentam espectro de absorção ressonante ao espectro visível de uma determinada fonte de luz, ocasionando a morte microbiana ou necrose celular por meio de reações do FS excitado com o substrato biológico,

além da sua seletividade em associar-se as células doentes. No entanto os FS devem cumprir determinadas características para serem usados como agente na TFD de forma a garantir a eficiência no processo fotodinâmico. Dentre as principais características, é possível destacar [15, 46]:

- a) Ser solúvel e permanecer estável em solução aquosa a pH fisiológico para permitir circulação e acúmulo nas células;
- b) Apresentar seletividade quanto à retenção por células malignas após algumas horas da introdução da droga na corrente sanguínea;
- c) Ter habilidade para o transporte passivo ou ativo dentro das células e ter um alvo intracelular bem conhecido;
- d) Possuir alto rendimento quântico (facilidade para absorver ou emitir fótons) nos estados tripleto ou singleto;
- e) Não ser tóxico a níveis terapêuticos, com mínima morbidez para o indivíduo;
- f) Ser metabolizado rapidamente, minimizando possíveis efeitos colaterais
- g) Farmacocinética favorável (rápida eliminação do corpo);
- h) Capacidade de penetração na membrana celular;
- i) Facilidade de obtenção em escala industrial a custos reduzidos e com boa reprodutibilidade.

Logo um FS ideal, utilizado para a ação terapêutica, segue a essas características indispensáveis à sua comercialização como agente fotossensibilizador. Uma característica muito importante, também, é o fato do FS não apresentar toxicidade no escuro, o que significa dizer que este agente não produzirá danos às células alvo sem que seja excitado por uma fonte de luz ressonante ao seu espectro de absorção. Se isso ocorresse seria um grande problema, pois mesmo após, ou antes, da aplicação da luz o FS estaria produzindo agentes prejudiciais às células.

Atualmente há várias substâncias que já foram potencializadas como sérios candidatos a FS, em sua maior parte são compostos orgânicos que constantemente estão sendo testados para vários tipos de câncer e para vários tipos de bactérias, sejam elas Gram (+) ou Gram (-). Dessa forma os principais FS usados são: as porfirinas, as ftalocianinas as fenotiazinas, as cianinas, as acridinas, os corantes fitoterápicos e as clorinas [15, 17].

O Brasil destaca-se por apresentar uma flora com grande diversidade, o que leva a potenciais candidatos a FS a ser descobertos. Assim na literatura emergem a todo o momento, trabalhos cujo objetivo de estudo é o manejo dos agentes microbianos através de extratos vegetais. Aproximadamente 80% da população dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento são quase completamente dependentes da medicina caseira utilizando plantas para as suas necessidades primárias de saúde [47].

Outro ponto importante no que concerne a utilização de FS em *aPDT* é que as bactérias Gram (+) são muito mais sensíveis à ação fotodinâmica do que as Gram (-) e que o FS ideal para exterminar tais bactérias deve ser catiônico [48, 49].

Os FS devem apresentar características semelhantes em relação ao seu uso para ação na *aPDT*, entretanto cada FS tem um pico ou vários picos de absorção ideal para a sua ação antimicrobiana. Sendo assim, segue a Tabela 3 com os principais FS e seus comprimentos de onda usados para inativação fotodinâmica.

**Tabela 3- Comprimento de onda máximo das bandas de absorção de fotossensibilizadores com aplicação em *aPDT*.**

Classe de fotossensibilizador	Fotossensibilizador	$\lambda$ máx. (nm)
Porfirinas	Porfirinas	Banda Soret ~400, Banda Q 500-630
Clorinas	Clorinas	~650
	Photodithazine	662
Bacterioclorinas		780
Ftalocianinas	Zn-Ftalocianinas (Pc4)	660-700
	Al-Ftalocianina tetrassulfonada	678
	Azul de metileno	661
	Azul de toluidina O	626
	Azure B	648-655
	Laranja de acridina	488
Riboflavinas		555
Xantenos	Rose Bengal	548
	Eosina Y	514
	Eritrosina B	525
	Fluoresceína	~491-496

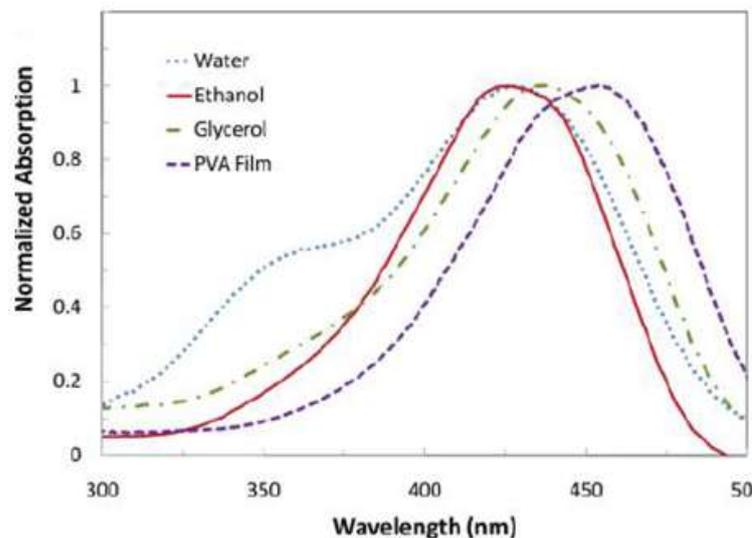
Fonte: BANGNATO, V.S, 2008 [15].

Na tabela 3 é observado o tipo de FS assim como o comprimento de onda ideal para a sua excitação. Sabe-se que a radiação de comprimento de onda menor sofre maior espalhamento e a presença de cromóforos endógenos nos tecidos, que absorvem em comprimento de onda menores, principalmente a hemoglobina, faz com que a penetração da luz seja menor. Entretanto, radiações com comprimento de onda acima de 800 nm sofrem a absorção pela água, o que restringe o comprimento de onda a este limite superior [28].

## 1.6 A Curcumina (Açafrão-da-Índia, *Curcuma Longa Linn*) como fotossensibilizador para a TFD.

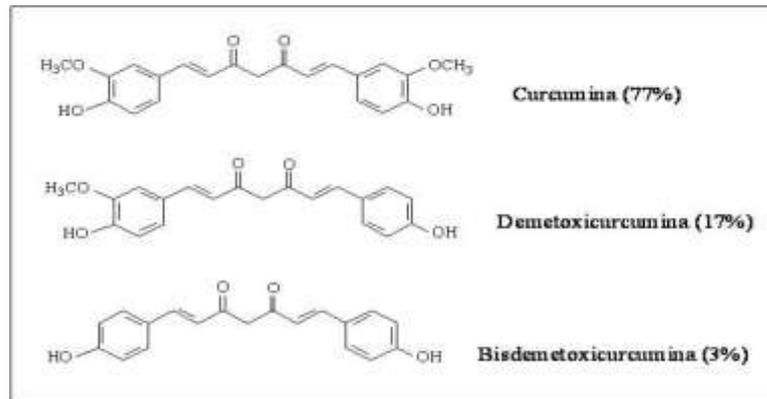
De acordo com a literatura, novos FS estão sendo testados para uso em TFD e *aPDT*. O número de teses, dissertações e artigos é cada vez maior na busca de novos agentes antimicrobianos. Um FS que apresenta ação antimicrobiana é a *Curcuma Longa Linn*. Segundo Dahl [50] esta substância quando irradiada por comprimento de onda específico, em concentração também específica apresenta um grande efeito fototóxico em bactérias Gram (+). Além de atuar como corante, a Curcumina, que é um pigmento que compõe um dos princípios ativos da *Curcuma Longa Linn*, tem seu primeiro isolamento datado de 1842 por Vogel [51]. É um pó retirado do rizoma da planta, insolúvel na água e no éter etílico, mas solúvel no etanol e no DMSO (dimetilsulfóxido), tem sido descrita em vários estudos como um potencial agente antioxidante, antimicrobiano e anti-inflamatório [52, 53, 54]. A Cúrcuma ou Curcuma apresenta um espectro de absorção com bandas em torno de 420 e 425 nm e é constituída por três curcuminóides: a Curcumina (77%), a demetoxiCurcumina (17%) e a bisdemetoxiCurcumina (3%), que lhe conferem a cor amarelo alaranjado típico. Na Figura 3 é apresentado o espectro de absorção da Curcumina em diferentes solventes e na Figura 4 mostramos as fórmulas estruturais dos curcuminóides [55, 56]. No espectro de absorção da Curcumina nota-se um deslocamento do pico a depender do solvente usado e o surgimento de um pico em 350 nm devido a solubilidade em água, o que pode indicar que a Curcumina neste solvente adota múltiplas conformações como resultado de interações polares [57].

**Figura 3- Espectro de absorção da *Curcuma Longa Linn* em diferentes solventes (água, etanol, glicerol e álcool polivinílico).**



Fonte: MUKERJEE, M, 2010 [57].

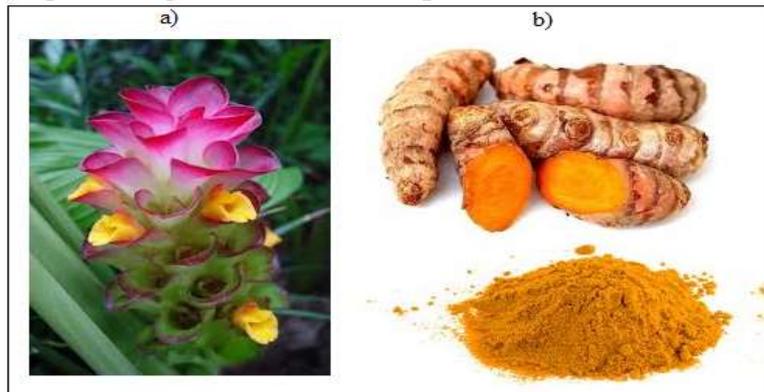
**Figura 4- Fórmulas estruturais dos curcuminóides da Curcuma.**



Fonte: RUSIG, O, 1992 [55]; TAKAHASHI, MY, 1987 [56].

Também conhecida como Açafrão da Índia (*Curcuma longa L.*), a Cúrcuma não é uma planta nativa do Brasil, no entanto ela é muito utilizada pelos brasileiros, seja na medicina popular, como tempero ou como corante alimentício. Na Figura 5 a seguir apresentamos a planta açafrão da Índia, assim como o seu rizoma.

**Figura 5- Açafrão da Índia. ((a) planta e (b) rizoma).**

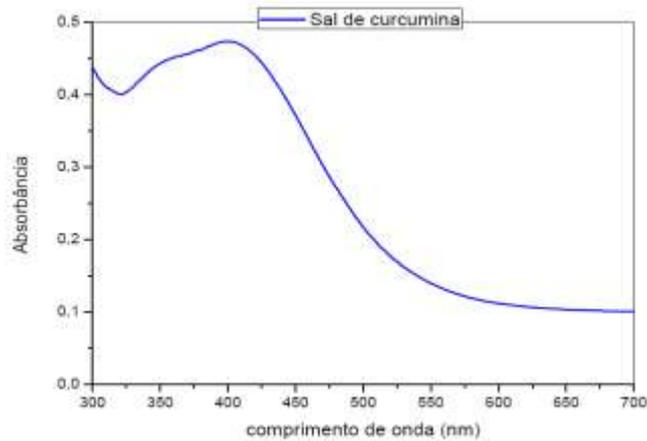


Fonte: a) <http://www.flickr.com/photos/buzatti/5731624204/>. b) <http://www.biovip.pt/natureza/-/acafrao-das-indias-177>. 2012.

É uma planta herbácea de origem indiana e asiática que foi trazida para o Brasil por meio dos seus colonizadores. É classificada como planta condimentar produtora de rizomas e faz parte da família das *Zingiberaceae* [51].

Neste trabalho foi usado o sal de Curcumina (sintetizado pela PDTPharma de Ribeirão Preto) numa formulação especial da Curcumina para que se torne solúvel em água. A sua curva de absorção está apresentada na Figura 6 a seguir.

**Figura 6- Espectro de absorção do sal de Curcumina, onde observamos um deslocamento da banda de absorção para 350 nm.**



Fonte: Autor, 2012.

Para Dahl [50] a Curcumina em uma série de estudos de cultura celular e uso em animais, apresentou-se atóxica, entretanto altas concentrações devem ser administradas para que a sua ação bactericida seja ativada. Por sua vez as bactérias Gram (+) se mostraram mais sensíveis a fototoxicidade da Curcumina do que as bactérias Gram (-), apresentando uma maior resistência a sua ação.

Ruby [58] verificou várias atividades biológicas da Curcumina, como a atividade anti-proliferativa contra as células cancerosas, atividade antioxidante, capacidade de cicatrização e atividade antimicrobiana em baixas concentrações (2 a 16  $\mu\text{g/mL}$ ).

O potencial anticarcinogênico da Curcumina é proveniente de sua capacidade para suprimir a proliferação de uma ampla variedade de células tumorais, por meio da regulação de fatores de transcrição, dos receptores do fator de crescimento, das moléculas de adesão na superfície celular, etc. Os ensaios clínicos em humanos não indicaram toxicidade limitante da dose quando administrado em doses até 10g/dia [59].

Bactérias Gram (+) como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus epidermidis*, têm sido inativadas com o uso da Curcumina. Estes microrganismos são a causa de várias doenças que vão da mais simples como a acne até as mais complexas como a meningite e a pneumonia [60].

Neste trabalho, a formulação de Curcumina dissolvida em água foi testada para avaliar a inativação de *S. aureus*, agente muito presente em queijo de coalho. A literatura já apresenta o desenvolvimento de vários estudos onde há resultados que descrevem a eficácia na atividade

antimicrobiana e antitumoral da Curcumina, sendo estudadas várias formulações dissolvidas em DMSO, álcool ou em água, os resultados são bem satisfatórios na inibição de bactérias.

### 1.7 Fontes de luz usadas para a TFD

Outro fator de suma importância para a TFD é a fonte de luz, que fará o papel de excitar o FS, fornecendo fótons que serão absorvidos pelos elétrons do FS, iniciando o processo de excitação, que foi descrito anteriormente no tópico 1.4. Logo no início das aplicações da Terapia Fotodinâmica era comum o uso de lâmpadas convencionais, pois apresentavam o seu espectro consonante com o pico de absorção dos fotossensibilizadores usados [9]. Porém, esta não era uma opção eficiente, pois estas lâmpadas, além de apresentarem rendimento muito baixo, apresentavam também um componente térmico associado e acentuado. Na década de 60 veio o advento do *laser* e consequentemente, este trouxe contribuições sem igual para o avanço da técnica, por apresentar um baixo componente térmico e uma pequena largura de banda espectral, configurando-se em uma luz monocromática com coerência espacial e temporal, além do que, é possível regular a sua potência e assim o *laser* tornou-se uma ferramenta fundamental para o uso em TFD. Uma grande vantagem do *laser* é que o tempo de exposição da luz aos tecidos pode ser diminuído, uma vez que seria possível alterar a potência empregada, fato que não ocorria com as lâmpadas convencionais. Outros importantes benefícios que vieram junto com o *laser* foram o fato da facilidade de calcular a dose de energia entregue ao tecido, a determinação com precisão da área irradiada e o controle na intensidade empregada. O *laser* se tornou ferramenta importantíssima não somente na TFD, mas também em outras áreas da medicina, odontologia, na indústria entre outros. De modo geral possibilitou que novas linhas de pesquisa surgissem sendo muito utilizado em pesquisas científicas em áreas a princípio distintas como, por exemplo, ciências exatas e ciências da vida [61].

O *laser* (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) provém da década de 60, onde foi desenvolvido comercialmente [62]. A luz *laser* provém da emissão que ocorre quando elétrons decaem de seus níveis energéticos de forma estimulada. O que lhe confere o caráter tão especial para o seu feixe é o fato de apresentar as seguintes características: monocromaticidade (onde a luz *laser* é emitida num único comprimento de onda), coerência (a emissão estimulada faz com que a radiação de muitos átomos seja sincronizada e apresente-se em fase espacial e temporalmente), o feixe é colimado (os raios do feixe luminoso são praticamente paralelos e com isso têm pouquíssima divergência), direção de propagação (um

feixe de fótons que são cópias idênticas uns dos outros numa mesma direção) e intensidade (onde os átomos ou moléculas em um *laser* irradiam de forma controlada, contribuindo muito para a energia num certo intervalo de tempo numa área muito pequena).

Alguns tipos de *laser*, a depender do seu meio ativo utilizado para produção da luz e de seu regime de operação (pulsado ou contínuo), são descritos na Tabela 4 abaixo:

**Tabela 4- Lista de alguns *lasers* comumente usados, seus meios ativos e linhas de emissão.**

Tipo de <i>laser</i>	Meio ativo	Comprimento de onda
Gasoso	He-Ne	632,8 nm, 1150 nm
	CO <sub>2</sub>	10060 nm
	Argônio (Ar)	488 nm, 514 nm (mais intensas)
	Nitrogênio	337 nm
Sólido	Rubi (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	694 nm
	Nd-YAG	1064 nm, 532 nm
	Er-YAG	2940 nm
	Ho-YAG	2100 nm
Líquido	Corantes	Todo espectro

Fonte: Adaptado de BANGNATO, V. S. 2008 [15].

Os *lasers*, como o de argônio, de vapores de metais, de diodo e de He-Ne, são muito usados em TFD, com comprimentos de onda na região do visível. Uma ressalva a ser feita é que os *lasers* de alta intensidade não são os mais indicados para a TFD, pois os efeitos fototérmicos podem mascarar os efeitos fotoquímicos desejados na terapia fotodinâmica, além do fato do risco de aumentar a temperatura na superfície radicular e, com isso, gerar danos aos tecidos circundantes [7, 15, 43, 46].

Quando o *laser* interage com o tecido biológico, a depender da intensidade entregue ao tecido, alguns fenômenos podem ocorrer. Logo, de acordo com o interesse de uso, este pode tanto bioestimular o tecido quanto provocar efeitos térmicos ou mesmo necrose celular. Dessa forma, a utilização do *laser* é dividida em duas categorias: *laser* de alta intensidade de energia (em inglês, *High intensity laser treatment* - HILT) e o *laser* terapêutico ou de baixa intensidade (em inglês, *low intensity laser therapy* -LILT). O laser em alta intensidade é utilizado em terapias mais invasivas, como procedimentos cirúrgicos, causando destruição celular pelo efeito térmico, desnaturando o conteúdo proteico celular, coagulando, vaporizando o conteúdo hídrico da célula e carbonizando o tecido. O *laser* em baixa intensidade é utilizado em terapias que não necessitam ou que não se deseja o efeito fototérmico, induzindo ao aumento da circulação sanguínea local, ação antiedematosa, ação antiálgica e proliferação celular [63].

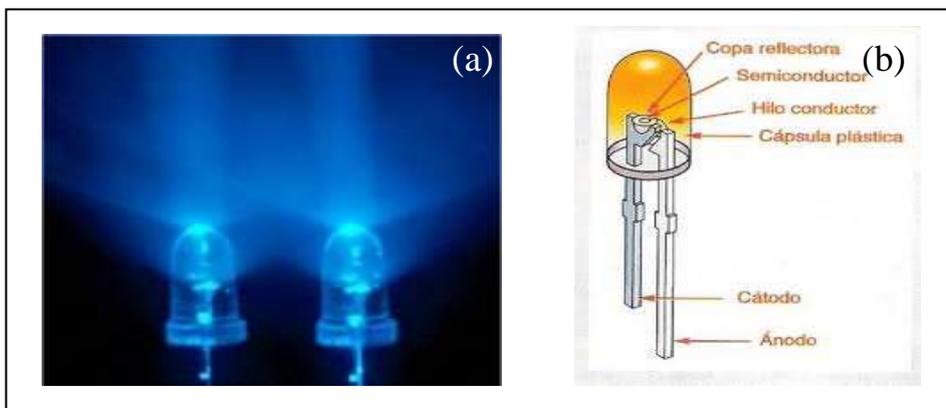
Os *LEDs* ou diodos emissores de luz (em inglês, *Light Emitting Diode-LED*) vêm sendo muito utilizados em Terapia Fotodinâmica e uma das vantagens do seu uso é o fato do seu baixo componente térmico, dos custos serem menores e por apresentarem uma pequena largura de banda espectral em relação às lâmpadas convencionais de tungstênio. Os *Leds* são dispositivos semicondutores, compostos por várias camadas de semicondutores dopados adequadamente, os quais emitem luz quando uma tensão é aplicada entre as camadas.

Esses dispositivos emitem luz por meio da movimentação de elétrons através de diferentes materiais semicondutores, produzindo uma emissão espontânea de fótons não coerentes, diferindo-se dos *lasers*, que produzem emissão estimulada de radiação. Desta distinção básica decorrem as diferenças estruturais entre os dois dispositivos [64]. Eles veem da combinação de dois semicondutores “n” e “p”, sendo que os n possuem excesso de elétrons e os p têm falta de elétrons (buracos). Os elétrons dos semicondutores do tipo n e os buracos dos semicondutores tipo p se conectam sempre que for aplicada tensão sobre a combinação dos dois tipos de semicondutores. O resultado é a emissão de uma luz especial com um comprimento de onda específico [15].

São componentes eletrônicos modernos, semelhante aos *lasers* de diodo (*lasers* semicondutores) utilizados em diversas áreas como laserterapia de baixa potência, aparelhos de CD e DVD, leitores de código de barras, e outros [7, 15].

Na Figura 7 (a e b) mostramos uma foto de um par de *LEDs* emitindo luz na região do azul e um esquema simplificado dos componentes de um *LED*, respectivamente.

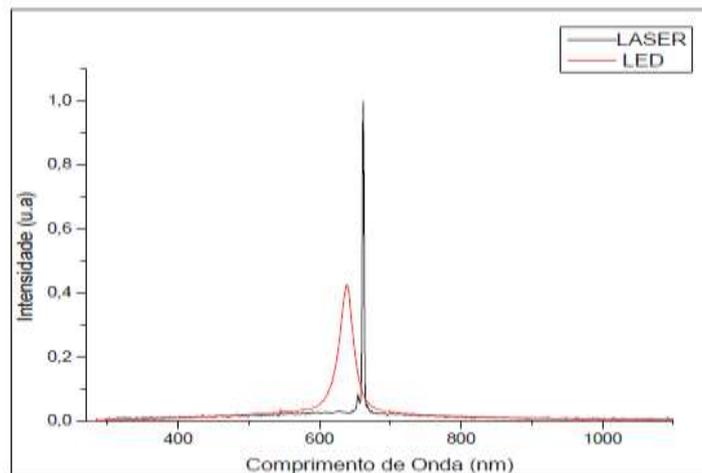
**Figura 7- Conjunto de *LEDs* emitindo na região do azul (a) e componentes de um *LED* (b).**



Fontes: (a) [http://www.inovacaotecnologica.com.br/noticias/imagens/010110020610-blue\\_leds\\_on\\_si.jpg](http://www.inovacaotecnologica.com.br/noticias/imagens/010110020610-blue_leds_on_si.jpg) e (b) <http://eficienciaenergtica.blogspot.com.br/2010/10/led-1.html>

Na Figura 8 podemos observar a comparação entre espectros de um *laser* e de um *LED*, onde notamos o quanto o *LED* apresenta uma banda espectral mais larga que a do *laser*, que permite uma ampla região de comprimentos de onda para a excitação dos fotossensibilizadores.

**Figura 8- Comparação entre espectros de um *laser* e de um *LED*.**



Fonte: Corazza, AV, 2005 [85].

Mesmo que o *LED* não apresente coerência, este está sendo largamente usado em TFD por ainda apresentar uma frequência mais bem definida do que lâmpadas convencionais de tungstênio e por sua relação custo/benefício.

### 1.8 *Staphylococcus aureus*

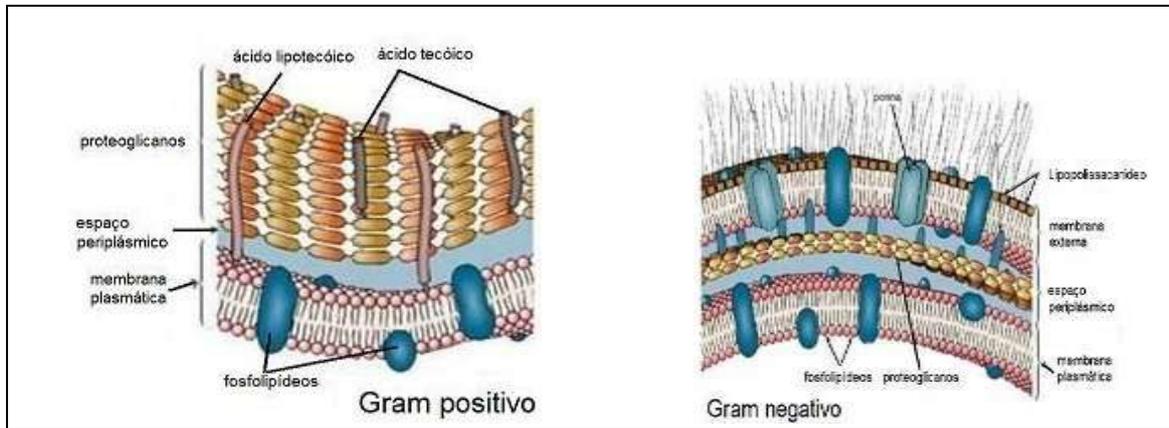
Bactérias são organismos unicelulares que apresentam características peculiares entre si. Elas são divididas em famílias, gêneros, morfologia, classes entre outros. Dentre tais diferenças há bactérias que são classificadas como Gram (+) ou Gram (-) (gram positivas e gram negativas, respectivamente). As bactérias Gram (+) apresentam parede celular formada por uma camada espessa de cerca de 10 a 80 nm e são permeáveis, enquanto que bactérias Gram (-) podem ser descritas por uma principal característica que é a presença de uma parede celular mais complexa, formada por uma bicamada lipídica.

Na Figura 9 (a e b) é mostrada a principal diferença entre as bactérias do tipo Gram (+) e Gram (-) ao que se refere à composição de sua parede celular.

Como bactérias Gram (-) e Gram (+) podemos listar as Gram (-): *Escherichia coli*; *Salmonella*; *Shigella*; *Enterobacteriaceae* (*Pseudomonas*; *Moraxella*; *Helicobacter*; *Stenotrophomonas*; *Bdellovibrio*; *Legionella*); *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Espiroquetas* entre

outras e as bactérias Gram (+): *Filo Firmicutes* (*Bacilos*, *Streptococos*, *Estafilococos*, *Enterococos*, *Actinobacteria*, *Listeria*) entre outras.

**Figura 9- Bactéria Gram (+) (a) e Bactéria Gram (-) (b).**



Fonte: Disponível em < <http://www.infoescola.com/microbiologia/bacterias-gram-positivas-e-gram-negativas>>. 2012.

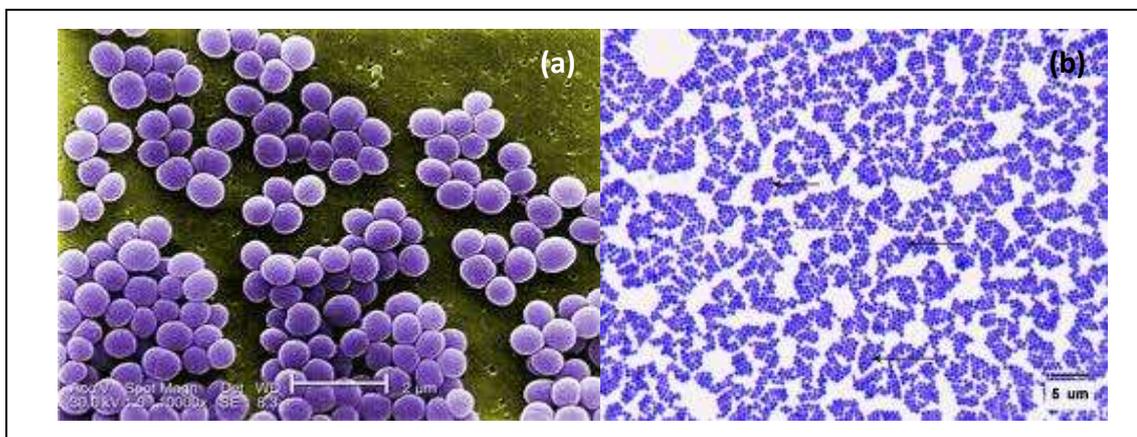
As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram positivos, pertencentes à família *Micrococcaceae* e por dividirem-se em planos diferentes, quando vistos ao microscópio aparecem na forma de cacho de uva, como visto na Figura 10 a e b. São facultativas anaeróbias, com maior crescimento em condições aeróbias, quando então, produzem catalase [65]. De acordo com o último *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1986), 19 espécies fazem parte deste gênero. Destas, as seguintes apresentam interesse potencial em microbiologia de alimentos: *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. chromogens* e *S. intermedius*, sendo *S. aureus* o mais importante.

A espécie *S. aureus* apresenta testes positivos para coagulase, catalase e termonuclease e é a que está associada mais frequentemente às doenças estafilocócicas, que sejam de origem alimentar ou não [65]. Os surtos de intoxicação alimentar são provocados por alimentos que permaneceram em temperatura de 10<sup>0</sup>C e 46<sup>0</sup>C por tempo variável, de acordo com o nível de inóculo e temperatura de incubação. *S. aureus* causa intoxicação provocada pela ingestão do alimento que apresenta a toxina pré-formada. Portanto, o agente causal não é a bactéria *per se*, mas várias toxinas produzidas por esta bactéria, conhecidas como enterotoxinas. Essas enterotoxinas são termoestáveis, podendo permanecer no alimento mesmo após o cozimento e são resistentes às ações das enzimas intestinais [66]. A intoxicação alimentar pela enterotoxina estafilocócica, é caracterizada por um período de incubação de 1 a 8 horas, provocando náuseas intensas, vômitos e diarreia. O *S. aureus* também produz outras toxinas

extracelulares como a toxina-1 da síndrome do choque tóxico, responsável pela síndrome do choque tóxico em humanos [67] e as toxinas esfoliantes, causadoras da síndrome da pele escaldada [68, 69].

Portanto, desde que o alimento apresente boas condições para o crescimento de *S. aureus*, o mesmo poderá causar intoxicação, como no caso do consumo de queijo de coalho, que apresenta características intrínsecas (pH, atividade de água e presença de nutrientes) favoráveis a sua multiplicação e conseqüente produção de enterotoxinas.

**Figura 10-** (a) *Staphylococcus aureus*, no microscópio eletrônico e (b) usando a coloração de Gram.



Fontes: a) <http://www.bacteriainphotos.com/Staphylococcus%20aureus%20electron%20microscopy.html>; b) <http://faculty.cbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab15/gpstaph.html>. 2012.

Outra característica bastante marcante de *S. aureus* é o fato desta ser resistente a condições severas e podem ser recuperadas de ambientes não-fisiológicos meses após a inoculação [70]. *S. aureus* coloniza uma porção extensa da população humana [71], onde o principal habitat de tais bactérias em humanos é a mucosa da nasofaringe, onde a bactéria existe como membro persistente ou transitório da microbiota normal sem causar quaisquer sintomas [72], podendo ser encontrado em outros sítios anatômicos [73] tais como a pele [74] e transitoriamente a orofaringe [75] e fezes [76]. Os portadores nasais e os manipuladores de alimentos com mãos e braços que apresentem feridas infectadas com *S. aureus* são importantes fontes de contaminação do alimento.

### 1.9 Queijo de coalho

Entende-se por queijo de coalho, aquele que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação

de bactérias lácticas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação. O queijo de coalho, de acordo as exigência estabelecida pela legislação brasileira, deve ser produzido com emprego do processo de pasteurização do leite [77]. Entretanto, apesar da grande importância socioeconômica do queijo de coalho para a região Nordeste, muitas vezes o produto é elaborado sem que sejam observados os padrões higiênico-sanitários. A qualidade e a segurança alimentar do queijo de coalho limitam sua comercialização. Quase sempre são elaborados de forma artesanal e normalmente a partir de leite cru, sem os devidos cuidados de higiene ou em pequenas indústrias que não adotam Boas Práticas de Fabricação [78]. Portanto, a contaminação microbiológica deste produto assume destacada relevância tanto para os produtores, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças [79]. Um dos microrganismos patogênicos de maior relevância e incidência em queijo de coalho tem sido *Staphylococcus* sp [80].

Vários estudos têm classificado o queijo de coalho, principalmente o artesanal, como impróprio para o consumo humano devido ao elevado nível de contaminação por bactérias patogênicas, dentre estas, a *E. coli* enteropatogênica, *L. monocytogenes*, *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva [81]. *S. aureus* é um dos agentes patogênicos mais comuns, responsável por surtos de intoxicação de origem alimentar pela enterotoxina estafilocócica [82].

A contaminação de queijos de coalho, produzido em vários estados do nordeste (CE, PB, RN e PE) por *S. aureus* variou entre  $10^3$  e  $10^6$  UFC/g [83]. Esses valores são preocupantes, pois situam-se acima dos limites estabelecidos pelos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e da Saúde, cujo máximo permitido é de  $10^3$  UFC/g [77, 84]. As vias de contaminação do queijo de coalho pode ser: o leite, o manipulador e o ambiente de processamento. No leite cru, a principal fonte de contaminação provém da mastite bovina, na qual *S. aureus* é o principal agente etiológico.

A contaminação de alimentos é um problema sério, uma vez que, causa grandes índices de morbidade. Abre-se então, a necessidade de desenvolver alternativas de conservação para que aliadas às tecnologias existentes seja possível disponibilizar para população alimentos de qualidade cada vez melhor e mais seguros sob o ponto de vista microbiológico e toxicológico.

## REFERÊNCIAS

1. Sternberg ED, Dolphin D, Brückner C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron*. 1998;54: 4151- 4202.
2. Garcez AS. Laser em baixa intensidade associado a fotoabsorvedor para redução bacteriana intracanal comparado ao controle químico [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2002.
3. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, et al. Photodynamic therapy. *J. Nat. CancerInst.* 1998;90:889–905.
4. Hamblin MR, Hasan, T. Photodynamic Therapy: A new antimicrobial approach to infections disease? *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004;3:436 - 450.
5. Gad F, Zahra T, Hasan T, Hamblin MR. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48:2173 – 2178.
6. Raab O. Ueber die Wirkung fluorizierender Stoffe auf Infusorien. *Z. Biol.*1900;39:524-546.
7. Bonnett R. Chemical aspects of photodynamic therapy. Singapore: Gordon and breach Science publishers; 2000.
8. Tappeiner VH. *Muench. Med. Wochenschr.* 1903;47:2024.
9. Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.*2001;74:656- 669.
10. Policard, A. Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examines a la lumiere de Wood. *CR Soc. Biol.* 1924;91:1423 - 1428.
11. Lipson RL. Em Proceedings of the 9th International Cancer Congress;Tokio, Japan, 1966.
12. Dougherty TJ, Mang TS. *Photochem. Photobiol.* 1987;46:67.
13. Perussi JR. Inativação Fotodinâmica de Microrganismos. *Quim. Nova.* 2007;30:988-994.
14. Simplicio FI, Maionchi F, Hioka N. Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, Aplicações e Avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quim. Nova.* 2002;25:801-807.
15. Bangnato VS. Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde. São Paulo: Livraria da Física; 2008.
16. Emilio CR. Comparação da eficácia do ácido 5-aminolevulínico com a de seu metil éster utilizando-se a terapia fotodinâmica no tratamento de carcinoma espinocelular felino [Tese]. São Paulo: IPEN, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo; 2008.

17. Griffiths MA, Wren BW, Wilson M. Killing of methicillin-resistant staphylococcus aureus in vitro using aluminium disulphonated phthalocyanine, a light-activated antimicrobial agente. *Journ antimicrobial Chemother.* 1997;40:873-876.
18. Rovaldi CR, Pievsky A, Sole NA, Friden PM, Rothstein DM, Spacciali P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against Oral Pathogens *In Vitro.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2000;44:3364-3367.
19. Wainwright M. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1998;42: 13-28.
20. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol* 2000. 2011; 55:143–166.
21. Hayek RRA, Araujo NS, Gioso MA, Ferreira J, Baptista-Sobrinho CA, Jr Yamada AM, et al. Comparative Study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dog. *Journal of Periodontology.* 2005;76:1275-1281.
22. Luan XL. *et al.* Histological evaluation of the safety of toluidina blue-mediated photosensitization to periodontal tissues in mice. *Lasers Med Sci,* 2009;24:162–166.
23. Oliveira RR, *et al.* Antimicrobial Photodynamic Therapy in the No-Surgical Treatment of Aggressive Periodontitis: A Preliminary Randomized Controlled Clinical Study. *Journal of Periodontology.* 2007;78:965-973.
24. Prates RA, et al. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B.* 2007;86:70–76.
25. Sigusch BW. *et al.* Full-Mouth Antimicrobial Photodynamic Therapy in Fusobacterium nucleatum–Infected Periodontitis Patients. *Journal of Periodontology.* 2010;81:975-981.
26. Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochemical and Photobiology Sciences.* 2004;3:412-418.
27. Von Tappeiner H, Jesionek A. U`ber die Wirkung der photodynamischen fluoreszierenden) Stoffe auf Infusorien. *Dtsch. Arch. Klin.Med.* 1904;80:427-487.
28. Soukos NS, et al. Photodestruction of Human Dental Plaque Bacteria: Enhancement of the Photodynamic Effect by Photomechanical Waves in an Oral Biofilm Model. *Lasers in Suggery and Medicine.* 2003;33:161-168.
29. Wainwright M, et al. Photoinactivation of viruses. *Photochemical and Photobiology Sciences.* 2004;3:406- 411.
30. Atieh MA. Photodynamic therapy as an adjunctive treatment for chronic periodontitis: a meta-analysis. *Lasers Med. Sci.* 2010;25:605–613.

31. Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K., Doucette S, Marcantonio RC, Boussios, CI, Kent R, Goodson JM, Tanner ACR, Soukos NS. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J. Periodontal. Res.* 2009;4:751–759.
32. Klepac-Ceraj V, Patel N, Song X., Holewa C, Patel C, Kent R, Amiji MM, Soukos NS. Photodynamic effects of methylene blue-loaded polymeric nanoparticles on dental plaque bacteria. *Lasers Surg. Med.* 2011; 43:600–606.
33. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 2005;79:159–170.
34. Pagonis TC, Chen J, Fontana CR, Devalapally H, Ruggiero K, Song X, Foschi F, Dunham J, Skobe Z, Yamazaki H, Kent R, Tanner ACR, Amiji MM, Soukos NS. Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. *J. Endod.* 2010;36:322–328.
35. Sousa GR. Análise comparativa da emissão de luz por led e lasers emitindo no vermelho do espectro eletromagnético na redução de bactérias periodontopatogênicas. Estudo “in vitro” [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.
36. Wainwright M. Pathogen Inactivation in Blood Products. *Current Medicinal Chemistry.* 2002;9:127-143.
37. Simone FGV, et al. Photodynamic inactivation of *S.aureus* and *Escheria coli* biofilms by malachite green and phenothiazine dyes: An in vitro study. *Archives of oral Biology.* 2012.
38. Bonnett R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chem Soc Rev.*1995; 24:19-33.
39. Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol.* 1991;54:659.
40. Jakson Z, et al. Killing of the Yeast and Hyphal Forms of *Candida albicans* Using a Light-Activated Antimicrobial Agent . *Lasers Med Sci.*1999;14:150–157.
41. Ribeiro MS, et al. Terapia fotodinâmica antimicrobiana. Aplicações na odontologia. Cap. 07; Livro Virtual; 25º CIOSP; São Paulo; 2005.
42. Wilson M, et al. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Current Microbiology.* 1992;25:77-81.
43. Niemz MH. *Laser-Tissue Interactions: Biological and medical physics, biomedical engineering.* 3ª ed. Springer; 2003.
44. Akhmanov SA, Cherniaeva EB. Photodynamic action of laser emission on biomolecules and cells. The mechanisms of photodynamic action at the molecular and cell levels. *Modern problems of laser physics.* 3ª ed. 1990.
45. Hultén LM, et al. Harmful singlet oxygen can be helpful. *Free Rad Biol Med.* 1999;27 :1203-1207.

46. Prasad PN. Introduction to Biophotonics. New Jersey. Wiley Interscience, 2003.
47. Catão RMR, et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. RBAC.2010: 42:9-14.
48. Bertoloni G, B. Salvato B, Dall'Acqua M, Vazzoler M, et al..Hematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Streptococcus faecalis*.Photochem. Photobiol. 1984; 39:811–816.
49. Malik Z, et al. The bactericidal activity of a deuteroporphyrin-hemin mixture on gram-positive bacteria. A microbiological and spectroscopic study. J. Photochem. Photobiol. B. 1990;6:419–430.
50. Dahl TA, et al., Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. Arch. Microbiol.1989;151:183–185.
51. Junior JF. *Curcumina e Câncer : antiproliferativo, antiapoptótico, antiangiogênico e antimetastático*. Disponível em <www.portaleducacao.com.br>.
52. Abe Y, et al. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. Pharmacol Res. 1999;39:41-47.
- 53.Literata A, et al. Regulation of pro-inflammatory cytokine expression by Curcumin in hyaline membrane disease (HDM). Life Sci.2001;70:253-267.
54. Ramsewak RS, et al. Cytotoxicity, antioxidan and anti-inflammatory activities of curcumins I-III from *Curcuma longa*. Phytomedicine. 2000;7:303-8.
55. Rusig O, Martins MC. Efeito da temperatura, do pH e da luz sobre extratos de oleorresina de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) e Curcumina. Revista Brasileira de Corantes Naturais. 1992;1:158-164.
56. Takahashi MY. Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2ª ed. São Paulo: 1987.
57. Mukerjee A, Sorensen TJ, Ranjan A P, et al . Spectroscopic Properties of Curcumin: Orientation of Transition Moments. J. Phys. Chem. B. 2010;114:12679 – 12684.
58. Ruby AJ, et al. Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. Cancer Letters. 1995;9:79-83.
59. Aggarwal, et al. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC.: Anticancer potencial of curcumin: preclinical and clinical studies. Anticancer Res. 2003;23:363-398.
60. Di Mario F, et al. A curcumin-based 1-week triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* infection: something to learn from failure? *Helicobacter*. 2007;12:238–243.
61. Bagnato V S. Laser e suas aplicações em Ciência e Tecnologia. Livraria da Física.1 ed. São Paulo-SP.2008.

62. Gutknecht N, Eduardo C. P. A odontologia e o laser: atuação do laser na especialidade odontológica. São Paulo: Quintessence, 2004. p.19-23.
63. Brugnera Jr A, et al. Laserterapia aplicada à clínica odontológica. São Paulo: Santos, 2003:78.
64. Karu T. Low-Power Laser Therapy. Biomedical Photonics Handbook. Fev. 2003:48-20.
65. Franco BDGM, Landgraff M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu, 2000.
66. Alcarãs LE, et al. Detección de *Staphylococcus aureus* spp. en manipuladores de alimentos. La Alimentación Latinoamericana, Buenos Aires. 1997; 219;44-47.
67. Carcoso HFT, et al. Production of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. Letters in Applied Microbiology, Oxford. 1999; 29:347-349.
68. Endo Y, et al. Phage conversion of exfoliative toxin A in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. Veterinary Microbiology, Amsterdam. 2003;96:81-90.
69. Santos AL, et al. Stapylococcus aureus: Visitando uma cepa de importância hospitalar. Jornal Bras. Pastol. Med. Lab. 2007;43:413-423.
70. Lisa RW, Plano MD. *Staphylococcus aureus* exfoliative toxins: How they cause disease. Journal of Investigative Dermatology, Baltimore. 2004;122:1070-1077.
71. Gill SR. et al. Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. Journal of Bacteriology, Washington. 2005;187:2426-2438.
72. Fueyo JM. et al. Relationships between toxin gene content and genetic background in nasal carried isolates of *Staphylococcus aureus* from Asturias, Spain. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam. 2005; 243:447-454.
73. Bhatia A, Zahoor S. *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: A Review. Journal of Clinical and Diagnostic Research, Delhi. 2007;1:188-197.
74. Noble WC. Skin bacteriology and the role of *Staphylococcus aureus*. British Journal of Dermatology, London. 1998;53:9-12.
75. Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. Journal of Medical Microbiology, Edinburgh. 2001;50:940-946.
76. Arvola T, et al. Rectal bleeding in infancy: clinical, allergological, and microbiological examination. Pediatrics, Evanston. 2006;117:760-768.
77. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 2 jan. 2001. p. 1-54.

78. Borges MF, et al. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no estado do Ceará, Brasil. Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Curitiba. 2003; 21:31-40.
79. Branco, et al. Incidência de *Listeria monocystogenes* em queijo de coalho refrigerado produzidos industrialmente. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, Curitiba, v. 21, n. 2, p 393-408. Jun/dez. 2003
80. Florentino ES, Martins RS. Características microbiológicas do queijo de coalho produzidos no Estado da Paraíba. Revista Higiene Alimentar, São Paulo. 1999;13:43-48.
81. Feitosa T, et al. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas. 2003; 23:162-165.
82. Cunha NA, Silva CGM, Stamford TLM. *Staphylococcus* Enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco. Brasil Ciênc Tecnol Aliment, Campinas. 2002; 22.
83. Nassu RT, et al. Diagnóstico das condições de processamento e qualidade microbiológica de produtos regionais derivados do leite produzido no Estado do Rio Grande do Norte. Revist do Instit de Latic Când Tost, Juiz de Fora. 2000; 55:21-126.
84. Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001/MAPA. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga. Diário Oficial da União – D.O.U., de 27 de junho de 2001.
85. Adalberto VC. Fotobiomodulação comparativa entre o Laser e LED de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutâneas de ratos [Dissertação]. São Carlos: Instituto de Física-USP; 2005.

## 2 INTERAÇÃO LUZ-MEIO BIOLÓGICO

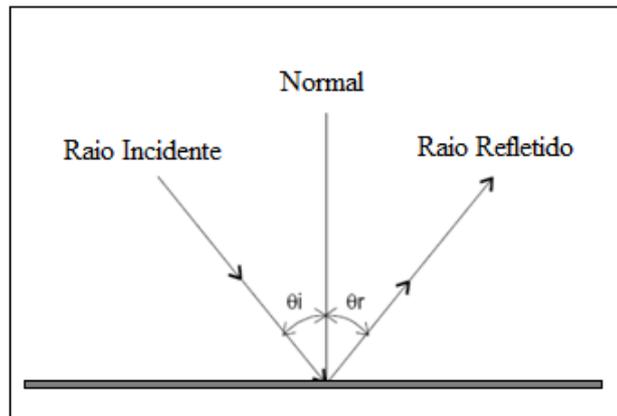
Na interação da luz com tecidos biológicos estão presentes processos primárias do tipo reflexão, refração, absorção e espalhamento, como também, interações secundárias baseadas nos danos macroscópicos da interação luz-tecido tais como mecanismos fotoquímicos, térmicos, mecânicos e fotoablativos [1, 2]. Neste trabalho será investigada a interação da luz com bactérias em suspensão em um meio de cultura líquido. Vários efeitos que ocorrem da interação luz-tecidos biológicos estarão presentes aqui, excetuando-se aqueles que são provenientes de altas intensidades e/ou que só atuem em meios do tipo “bulk” (um volume de matéria). A caracterização da propagação da luz em um tecido biológico é dada por três parâmetros no que diz respeito ao ponto de vista macroscópico, são eles: a função de fase, que fornece informação sobre a distribuição angular da luz espalhada, e os coeficientes de absorção e espalhamento, que informam sobre a atenuação do feixe devido aos processos de absorção e espalhamento. O coeficiente de anisotropia,  $g$ , os coeficientes de absorção,  $\mu_a$ , e o coeficiente de espalhamento,  $\mu_s$ , são os parâmetros mais usados para caracterizar a interação da luz com os meios. Descreveremos a seguir os efeitos presentes na interação da luz com o meio biológico investigado.

### 2.1 Reflexão e Refração da onda eletromagnética

A reflexão é definida como o retorno da radiação eletromagnética por uma superfície incidente. Dessa forma, uma parte do feixe que incide em uma superfície com ângulo  $\theta_i$ , será refletida em um ângulo de reflexão  $\theta_r$ , ambos em relação à normal à superfície de separação. Os ângulos  $\theta_i$  e  $\theta_r$  são iguais, como descritos na Figura 11.

Em certos materiais como água, vidro, tecidos biológicos e outros, é sabido que a luz consegue penetrar, e em alguns casos até mesmo atravessá-los. Quando a onda eletromagnética atravessa estes meios há uma mudança em sua velocidade de propagação e este efeito é definido como Refração. Logo, se define como refração a mudança de velocidade de propagação de uma onda eletromagnética, quando esta passa de um meio para o outro.

**Figura 11- Reflexão de um feixe de luz por uma superfície plana.**



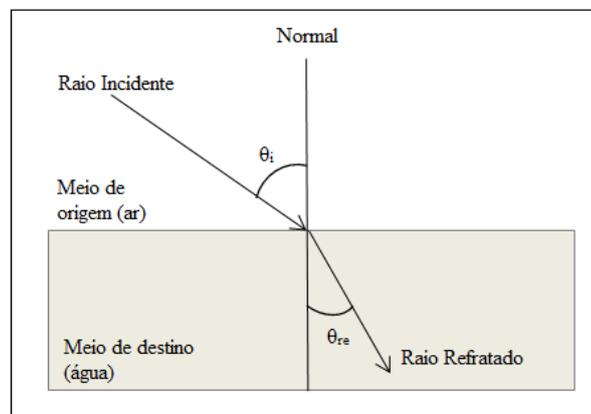
Fonte: Autor, 2012.

Observando a Figura 12, nota-se que o ângulo de incidência  $\theta_i$  é diferente do ângulo de refração  $\theta_{re}$ . Esse fenômeno é regido pela Lei de Snell dada pela equação (2.1).

$$n_i \cdot \text{sen} \theta_i = n_{re} \cdot \text{sen} \theta_{re} \quad (2.1)$$

Onde  $n_i$  é o índice de refração do meio de origem e  $n_{re}$  é o índice de refração do meio de destino.

**Figura 12- Refração de um feixe de luz se propagando do meio de origem (ar) para o meio de destino (água).**



Fonte: Autor, 2012.

O índice de refração absoluto ( $n$ ) de um meio é dado pela relação entre a velocidade da luz no vácuo ( $c$ ) e a velocidade de propagação no meio em questão ( $v$ ), esta relação está expressa na equação (2.2) abaixo.

$$n = \frac{c}{v} \quad (2.2)$$

## 2.2 Absorção

A absorção de luz por um determinado meio é dada pela quantidade de radiação que não atravessa esse meio, ou seja, é a capacidade que certo material tem de absorver radiação em uma frequência ou comprimento de onda, e a sua medida é chamada de absorvância que é definida como a razão da intensidade de luz absorvida pela incidente. Durante a absorção a intensidade da onda eletromagnética varia ao passar através de um meio [1, 2]. Assim, quando a luz incide em um meio, o campo elétrico incidente, eq. (2.3), induz um movimento oscilatório nas cargas que o constituem.

$$\vec{E} = |E_0|e^{(\vec{k}\cdot\vec{r}-\omega t)} \quad (2.3)$$

Em boa parte dos casos estes movimentos oscilatórios induzem colisões, que aumentam a energia cinética das partículas envolvidas. Com isso a energia de oscilação associada ao campo incidente é, na sua maior parte, dissipada como calor no meio. O efeito final da absorção é a diminuição de intensidade do feixe de luz que atravessa a amostra [3, 4]. O coeficiente de absorção  $\mu_a$  ( $\text{mm}^{-1}$ ) é definido pela lei de *Lambert-Bouguer*:

$$dI = -\mu_a I dx \quad (2.4)$$

Temos que  $dI$  é a mudança infinitesimal da intensidade  $I$  que um feixe colimado sofre ao percorrer uma distância  $dx$  num meio com coeficiente de absorção  $\mu_a$ . Integrando a expressão (2.4) temos:

$$I(x) = Ae^{\mu_a x} \quad (2.5)$$

Para  $x = 0$ , temos que  $I(0) = A$ , logo podemos escrever a equação 2.5 como:

$$I = I_0 e^{-\mu_a x} \quad (2.6)$$

Dessa forma o coeficiente de absorção pode ser interpretado como a probabilidade de absorção por unidade de comprimento para um dado fóton. O comprimento de absorção é definido como o inverso de  $\mu_a$  e representa a distância necessária para que a intensidade do feixe incidente diminua para  $\frac{1}{e}$  da intensidade inicial. Quando a expressão (2.6) é escrita em log de base 10, temos:

$$I = I_0 10^{-kx} \quad (2.7)$$

onde a constante  $k$  representa o coeficiente de extinção.

Outro termo bastante importante é a absorvância da amostra que é definida como:

$$A = \log_{10} \left( \frac{I_0}{I} \right) \quad (2.8)$$

Substituindo a eq. (2.7) na eq. (2.8), temos a seguinte expressão:

$$A = kx \quad (2.9)$$

Os coeficientes de extinção e absorção são conceitualmente equivalentes. Para as mesmas unidades de comprimento, estes dois coeficientes diferem apenas por um fator de 0,434, pois  $\log_{10}(e) = 0,4342$ . Em 1852 Beer achou a relação linear que determina a relação entre  $\mu_a$  e a concentração “ $c$ ” de um material diluído num meio não absorvedor como:

$$\mu_a = \alpha c \quad (2.10)$$

Onde  $\alpha$  é o coeficiente de absorção específico de determinada amostra. Substituindo a eq. (2.10) na eq. (2.6) temos:

$$I = I_0 e^{-\alpha c x} \quad (2.11)$$

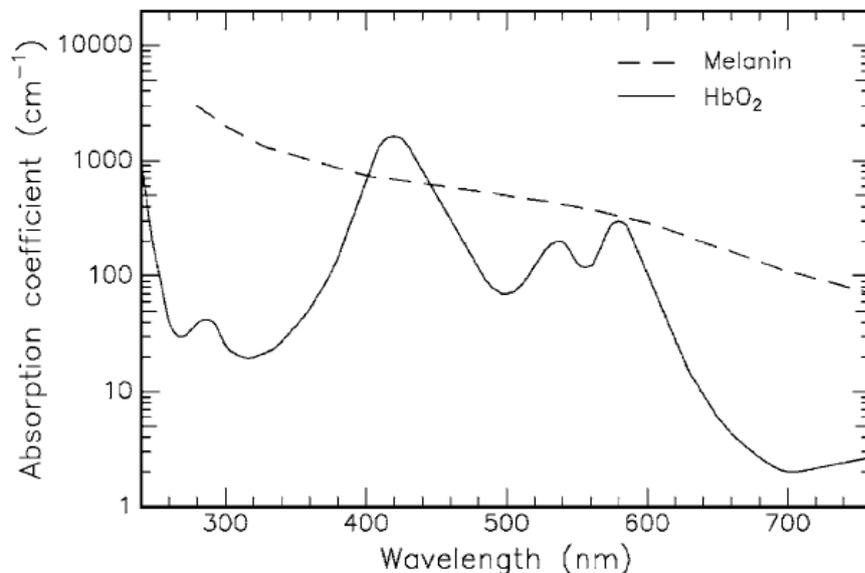
A expressão 2.11 acima é a conhecida lei de *Beer-Lambert*.

A capacidade de um meio absorver radiação eletromagnética depende de uma série de fatores, principalmente a constituição eletrônica de seus átomos e moléculas, o comprimento de onda da radiação, a espessura da camada absorvente e os parâmetros internos, tais como a temperatura ou a concentração das substâncias presentes na amostra [1].

No caso dos tecidos biológicos a absorção típica é causada principalmente por moléculas de água ou macromoléculas como proteínas e pigmentos. Na Figura 13 observamos os picos de absorção de dois constituintes da pele humana que são a melanina e a

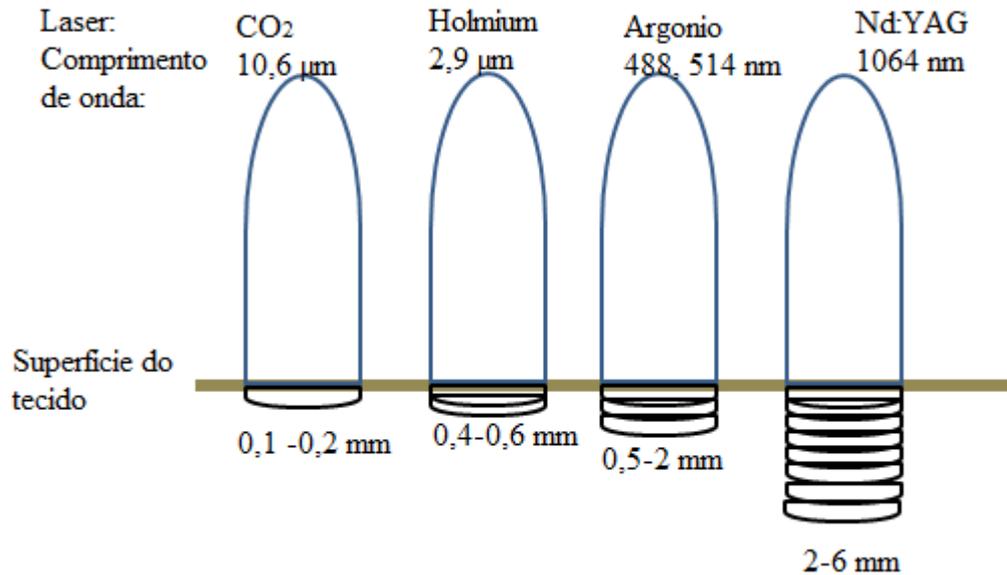
hemoglobina. A melanina é o pigmento básico da pele e é o mais importante da epiderme. Seu coeficiente de absorção aumenta monotonamente do visível ao UV, enquanto que a hemoglobina é um constituinte dos tecidos humanos que está presente nos glóbulos vermelhos e permite o transporte de oxigênio pelo sistema circulatório apresentando picos em 280 nm, 420 nm, 540 nm e 580 nm e na região acima de 580 nm a sua intensidade de absorção é decrescente. Nota-se que entre a faixa de 600 a 700 nm há uma menor absorção desses dois compostos, o que configura uma possível faixa de ação terapêutica, pois a chamada “Janela Terapêutica” que normalmente esta delineada entre 600 a 1200 nm [1] corresponde a uma região que a maioria dos tecidos animais absorve luz em uma menor intensidade. Neste caso é uma faixa espectral em que a radiação não é absorvida pela pele, penetrando em tecidos biológicos com uma menor perda, permitindo que estruturas mais profunda dos tecidos possam ser eventualmente tratadas, fato esse necessário a determinadas terapias que fazem o uso de luz. Na Figura 14 é observado que na região do visível, quanto maior o comprimento de onda maior será a profundidade de penetração da luz no tecido. Essa observação está intrinsecamente relacionada com o fato de que tanto a absorção quanto a intensidade de espalhamento serão menores neste intervalo. Na região do infravermelho ocorrem outras absorções que limitam o poder de penetração da luz.

**Figura 13- Janela Terapêutica da Melanina e Hemoglobina.**



Fonte: NIEMZ, 2003 [1].

**Figura 14- Profundidade de penetração de comprimentos de ondas de luz laser usuais, em tecidos.**

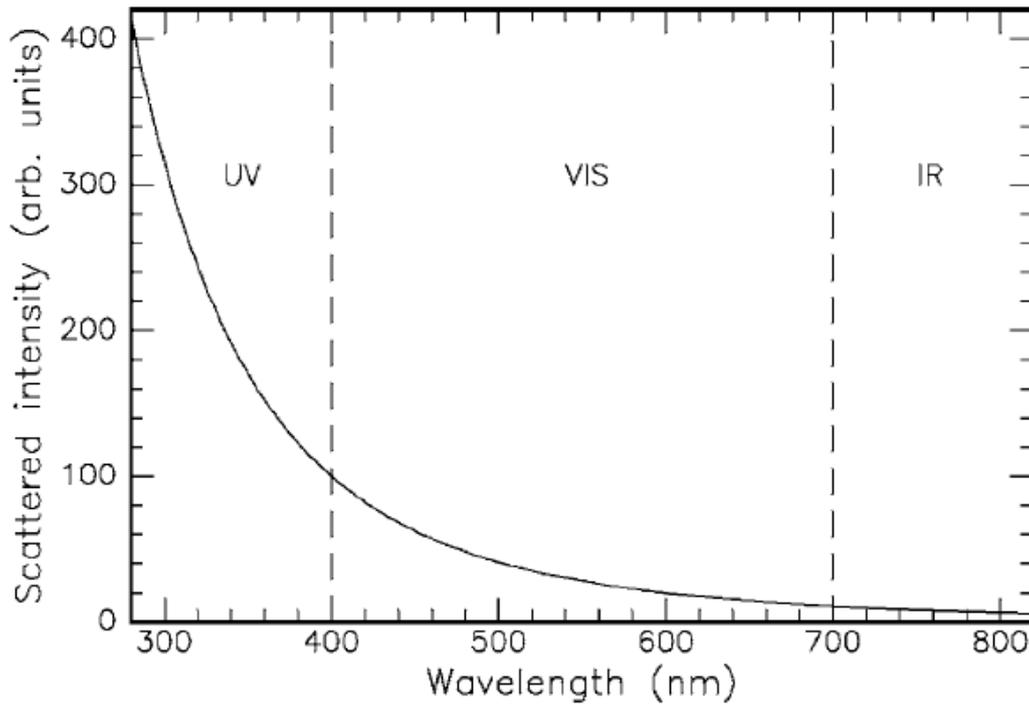


Fonte: Adaptado do PRASAD, P. N. 2003 [2].

### 2.3 Espalhamento

As estruturas celulares são constituídas normalmente por água e compostos orgânicos. As células animais, vegetais ou bacterianas apresentam organelas internas com dimensões variadas consideradas possíveis centros espalhadores. As dimensões das estruturas citológicas compreendem uma faixa que segue de algumas dezenas de nanômetros até alguns micrometros. Considerando as ondas eletromagnéticas na faixa do visível (400 a 700 nm) e o tamanho dos centros espalhadores, observa-se que o espalhamento está no regime Mie ou Geométrico, no entanto o espalhamento Rayleigh, que corresponde a um espalhamento em que o comprimento de onda é maior que os centros espalhadores, pode também estar presente no processo [2]. Principalmente em tecidos biológicos os três tipos de espalhamentos estão presentes, uma vez que os constituintes teciduais compreendem uma faixa ampla de dimensões. Na Figura 15 nota-se que a intensidade de espalhamento diminui na região do visível. Combinando essa observação com o fato da luz penetrar mais nos tecidos para comprimentos de onda maiores, leva-nos ao uso de luz vermelha para aplicação de TFD em tecidos [5, 6, 7], enquanto que na região do ultravioleta, há uma acentuada intensidade de espalhamento além de ser uma faixa do espectro com uma taxa alta de absorção pela pele [1].

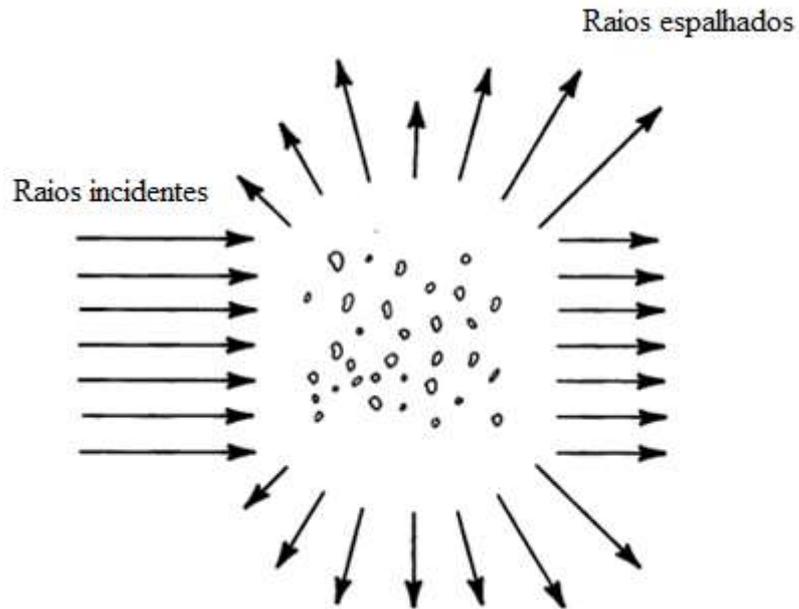
**Figura 15- Intensidade de espalhamento do espectro visível.**



Fonte: NIEMZ, 2003 [1].

Entende-se por espalhamento o desvio da radiação eletromagnética em uma direção qualquer, quando esta incide em um determinado centro espalhador, que pode ser maior ou menor que o comprimento de onda incidente, além do que o centro espalhador pode assumir uma forma esférica ou uma forma arbitrária e o meio em que este se encontra pode ser absorvedor como é o caso dos tecidos, transparente, rugoso, entre outros. Na Figura 16 é mostrado a ilustração do espalhamento por um conjunto de partículas, que por sua vez desviam a radiação eletromagnética em todas as direções. O espalhamento de luz pode ser elástico, inelástico ou quasi-elástico [1, 2, 8]. No espalhamento inelástico a luz espalhada possui comprimento de onda maior que a luz incidente (Brillouin e Raman). Enquanto que o espalhamento elástico não altera o comprimento de onda da radiação (Mie e Rayleigh), fato que é justificado quando os centros espalhadores são estáticos de forma a alterar apenas a direção de propagação das ondas incidentes. E no espalhamento quasi-elástico, a frequência da onda espalhada é ligeiramente distinta da onda incidente. O espalhamento Rayleigh ocorre quando os centros espalhadores são menores que o comprimento de onda da radiação incidente [9]. Por outro lado, o espalhamento Mie ocorre quando as dimensões dos centros espalhadores são da mesma ordem do comprimento de onda [1, 2].

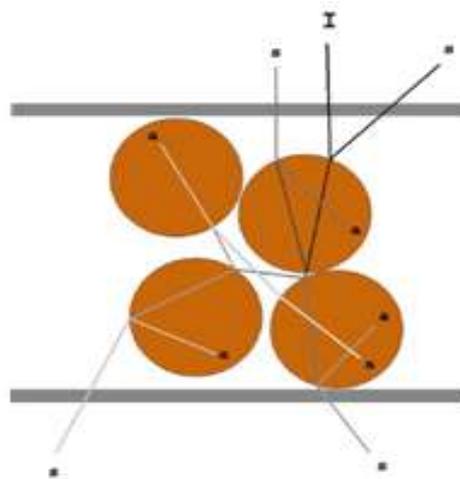
**Figura 16- Espalhamento de luz por um conjunto de partículas**



Fonte: HUFFMAN, D. R, 1998 [9].

O espalhamento Geométrico é caracterizado quando os centros espalhadores são maiores que o comprimento de onda da radiação incidente, de modo que a luz penetra seu interior e sofre varias reflexões e refrações. A Figura 17 apresenta um esquema do espalhamento geométrico.

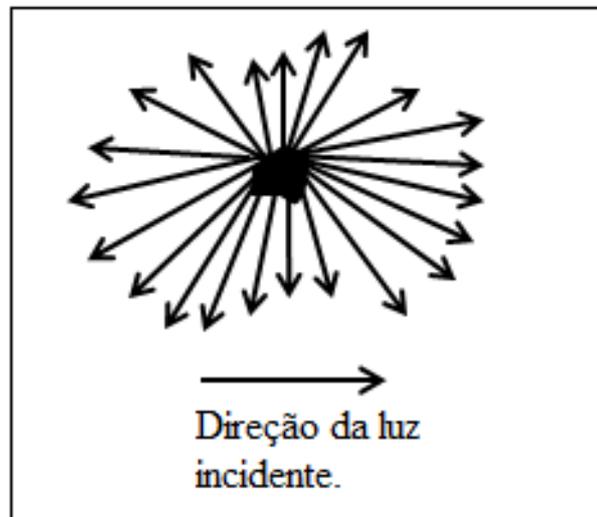
**Figura 17- Esquema de espalhamento geométrico**



Fonte: Silva, ER, 2007 [23].

O espalhamento de luz por uma partícula arbitrária, não tem uma solução geral analítica. Entretanto, existem soluções exatas para formas particulares e métodos numéricos para formas arbitrárias [10], ao recorrer a aproximação para vários limites da relação entre comprimento de onda e o diâmetro das partículas. Existem também dois regimes distintos que são o espalhamento simples e o espalhamento múltiplo. No caso do espalhamento simples assume-se que a luz é espalhada apenas uma vez. Ou seja, a distância entre as partículas é grande o suficiente para garantir que a luz apenas interage uma vez antes de sair do volume considerado. Neste caso temos o espalhamento Rayleigh, onde as suas soluções apresentam uma dependência do tipo  $\lambda^{-4}$  e são bem conhecidas. Este espalhamento é responsável pela cor azul do céu. Na Figura 18 é mostrado um esquema de espalhamento Rayleigh por uma luz incidente em uma partícula arbitrária.

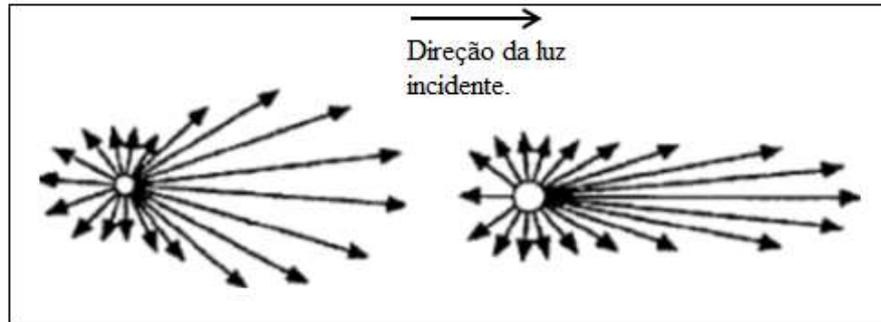
**Figura 18- Esquema de espalhamento Rayleigh, mostrando que a luz é espalhada sem preferência de direção.**



Fonte: Manual do Observatório Nacional, 2011 [11].

Outro espalhamento elástico provocado por centros espalhadores com dimensões da ordem do comprimento de onda da luz incidente é o espalhamento Mie. A direção do espalhamento é preferencialmente para frente, como visto na Figura 19. Este modelo resulta das equações de Maxwell para esferas homogêneas [2, 9].

**Figura 19- Esquema de espalhamento Mie, mostrando que a direção de espalhamento preferencial é na direção de propagação da luz incidente**

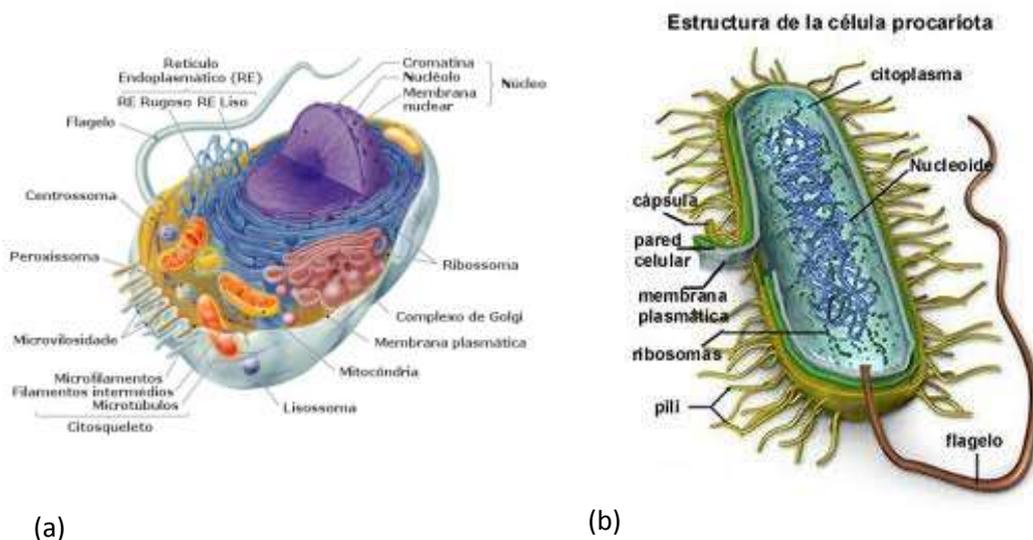


Fonte: Manual do Observatório Nacional, 2011 [11].

O espalhamento da luz em meios biológicos deve-se principalmente a heterogeneidades como membranas celulares ou componentes intracelulares. As diferenças entre os índices de refração das várias estruturas celulares está na origem do espalhamento. Na Figura 20 é possível observar as estruturas de uma célula animal e de uma célula bacteriana com os seus componentes internos que são possíveis centros espalhadores. Podemos observar algumas organelas como: mitocôndrias, ribossomos, lisossomos entre outros.

Células biológicas apresentam uma faixa de tamanho que varia muito. No caso de célula animal vai desde 4  $\mu\text{m}$ , das plaquetas sanguíneas, até 1 m, de certas células nervosas, enquanto que para as bactérias varia de 0,5  $\mu\text{m}$  até 1,5  $\mu\text{m}$  (caso do *Staphylococcus aureus*) [2].

**Figura 20- Exemplo de uma célula animal (a) e uma célula bacteriana (b).**



Fonte: <http://www.tudomaisumpouco.com/bioaula1.html>, 2012.

Estruturas como membrana celular, citoplasma e núcleo, comportam-se como centros espalhadores, no entanto certas estruturas contribuem para o espalhamento mais que outras, dados mostram que cerca de 73% do espalhamento em células de fígado de rato é devido às mitocôndrias [12].

## 2.4 Meios Túrbidos

Os meios túrbidos são definidos como meios não homogêneos em que a luz é impossibilitada de se propagar em linha reta e com velocidade constante ao atravessá-lo e, além disso, outra característica destes meios é a forte difusão da luz caracterizada pela concentração de partículas indutoras de não homogeneidades aleatórias [1], neste caso os tecidos biológicos são classificados como meios túrbidos. A utilização das equações de Maxwell para descrever o comportamento da luz em meios túrbidos torna-se muito complexa, entretanto uma alternativa muitas vezes utilizada é a teoria de transporte radiativo [13].

Esta teoria abandona a descrição em termos da natureza ondulatória da luz e trata apenas o transporte de fótons que podem ser absorvidos ou espalhados pelo meio. A equação do transporte radiativo (ETR) é dada por:

$$\frac{1}{v} \frac{\partial I(\vec{r}, t, \hat{s})}{\partial t} + \hat{S} \cdot \vec{\nabla} L(\vec{r}, t, \hat{s}) = -(\mu_a + \mu_s) I(\vec{r}, t, \hat{s}) + \mu_s \int_{4\pi} p(\hat{s}, \hat{s}') d^2 \hat{s}' + \varepsilon(\vec{r}, t, \hat{s}) \quad (2.12)$$

A qual descreve o comportamento da energia radiante (radiância)  $L(\vec{r}, t, \hat{s})$  ( $Wcm^{-2}sr^{-1}$ ) no meio, ou seja, a energia na posição  $\vec{r}$  que se propaga na direção  $\hat{s}$  dentro de um ângulo sólido  $d\omega$ , por unidade de tempo  $t$  e por unidade de área perpendicular a  $\hat{s}$ . Os outros parâmetros que interveem na ETR são a velocidade da luz no meio,  $v$ , os coeficientes de absorção e espalhamento,  $\mu_a$  e  $\mu_s$  respectivamente, a função de fase  $p$  e  $\varepsilon(\vec{r}, t, \hat{s})$  o termo de fonte da radiação.

No caso em que o espalhamento domina a absorção temos que,

$$\mu'_s \gg \mu_a \quad (2.13)$$

e assumindo que a fonte luminosa e o espalhamento são isotrópicos, pode mostrar-se que a ETR se reduz a uma equação de difusão [14], como podemos ver na equação 2.14 a seguir:

$$\frac{1}{v} \frac{\partial \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t} - D \nabla^2 \Phi(\vec{r}, t) + \mu_a \Phi(\vec{r}, t) = \varepsilon(\vec{r}, t) \quad (2.14)$$

Onde  $\Phi$  representa a fluência que se relaciona com a energia radiante, de acordo com a equação 2.15 abaixo:

$$\Phi(\vec{r}, t) = \int_{4\pi} L(\vec{r}, t, \hat{s}') d\hat{s} \quad (2.15)$$

O coeficiente de difusão,  $D$ , é definido como:

$$D = \frac{1}{3(\mu_a + (1-g)\mu_s)} \quad (2.16)$$

Temos que  $g$  é o fator de anisotropia que determina a direção e o sentido do fóton incidente. Estas equações estão de acordo com a intuição de que se o espalhamento dominar a absorção, os fótons espalham-se aleatoriamente (difundem-se) pelo tecido antes de serem absorvidos [3]. O processo de difusão em questão é semelhante ao da difusão do calor e é descrito por uma equação do mesmo tipo. As condições de aproximação da difusão são satisfeitas pela maior parte dos tecidos biológicos, dando uma aproximação válida para o tratamento da propagação da luz nestes meios.

## 2.5 Interações Fotoquímicas

Células exibem uma variedade de processos fotofísicos e fotoquímicos, seguido por absorção de luz. O termo “mecanismos fotoquímicos” é usado para tratar acerca da produção de moléculas a partir de espécies químicas excitadas (excitação eletrônica) após absorção de fótons [15]. Segundo Prasad [2] há vários processos de interação da radiação com a matéria, tais como: fotoadição, fotofragmentação, fotooxidação, fotohidratação entre outros.

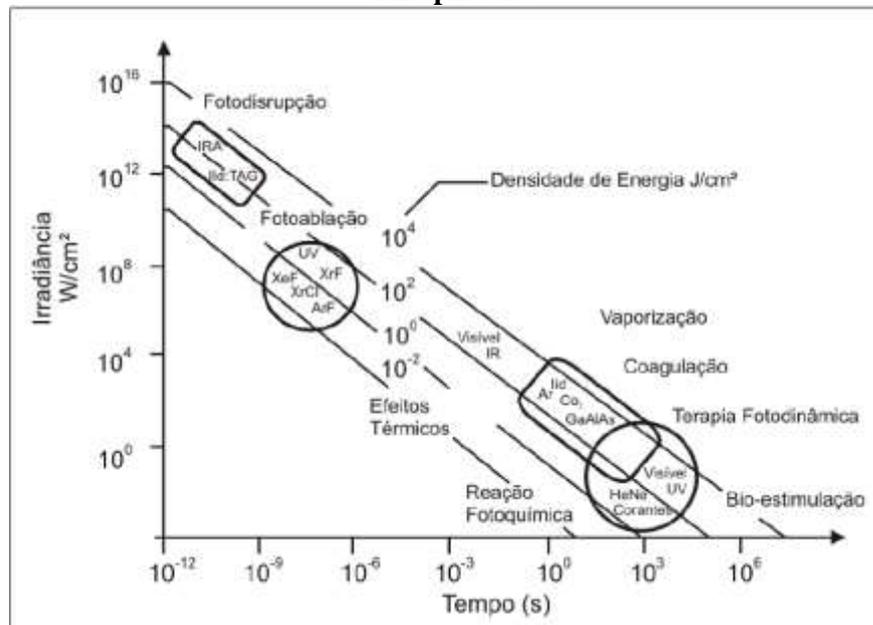
O processo fotoquímico, que é um dos mecanismos possíveis de decaimento das espécies excitadas, que são naturalmente instáveis, pode ser representado por:





Neste caso a molécula (A) ao absorver fóton passa para um estado excitado  $A^*$  que pode decair para o estado fundamental por processo radiativo ou não radiativo. Há algumas importantes reações fotoquímicas que são produzidas por absorção de luz em substâncias químicas introduzidas em células ou tecidos, como é o caso dos fotossensibilizadores usados para a Terapia Fotodinâmica [16, 17, 18, 19]. Na Figura 21 são mostradas as principais interações que ocorrem em meios biológicos de acordo com a dose de luz fornecida.

**Figura 21- Esquema das principais interações da radiação com a matéria enfatizando a dose de luz aplicada.**



Fonte: Adaptado do NIEMZ, 2003 [1].

De acordo com a Figura 21 acima, os principais tipos de interação são as: Interações fotoquímicas, térmicas, fotoablação e fotodisrupção. Uma característica que diferencia estas interações é a densidade de energia aplicada, a ordenada expressa a irradiância dada em  $W/cm^2$  e a abscissa representa o tempo de exposição dado em segundos. As linhas diagonais representam a fluência de energia aplicada em cada interação sendo que a densidade de energia aplicada em laser médicos varia de  $1 J/cm^2$  até  $1000 J/cm^2$ . O tempo de exposição parece ser o principal parâmetro responsável para a variedade de mecanismos de interação. No âmbito das interações fotoquímicas, destaca-se a bioestimulação e a terapia fotodinâmica [1].

Logo ao receber luz de comprimento de onda superior a 800 nm, ocorre absorção da radiação pelas moléculas de água sem excitação eletrônica, ocasionando apenas um pequeno aquecimento do tecido. A baixa penetrabilidade de radiações de frequências maiores (região ultravioleta) é decorrente da forte absorção desta por componentes do extrato biológico e ao acentuado espalhamento de luz. Na tabela 5, são apresentadas as principais reações fotoquímicas que acontecem na interação de um fotossensibilizador com a radiação eletromagnética [16, 20]. Em especial, na região de absorção do fotossensibilizador, observamos mecanismos de absorção, decaimento, transferência de energia e reações com biomoléculas para a formação de radicais livres [1, 2, 5].

**Tabela 5- Cinética de fotossensibilização (S: fotossensibilizador, RH: substrato com ligação-H, CAR: carotenóide). Modificada de Boulnois (1986).**

<b>Excitation</b>	
Singlet state absorption	$^1S + hv \rightarrow ^1S^*$
<b>Decays</b>	
Radiative singlet decay	$^1S^* \rightarrow ^1S + hv'$ (fluorescence)
Nonradiative singlet decay	$^1S^* \rightarrow ^1S$
Intersystem crossing	$^1S^* \rightarrow ^3S^*$
Radiative triplet decay	$^3S^* \rightarrow ^1S + hv''$ (phosphorescence)
<b>Nonradiative triplet decay</b>	$^3S^* \rightarrow ^1S$
<b>Type I reactions</b>	
Hydrogen transfer	$^3S^* + RH \rightarrow SH^* + R^*$
Electron transfer	$^3S^* + RH \rightarrow S^{\bullet-} + RH^{\bullet+}$
Formation of hydrogen dioxide	$SH^* + ^3O_2 \rightarrow ^1S + HO_2^*$
Formation of superoxide anion	$S^{\bullet-} + ^3O_2 \rightarrow ^1S + O_2^*$
<b>Type II reactions</b>	
Intramolecular exchange	$^3S^* + ^3O_2 \rightarrow ^1S + ^1O_2^*$
Cellular oxidation	$^1O_2^* + cell \rightarrow cell_{ox}$
<b>Carotenoid protection</b>	
Singlete oxygen excitation	$^1O_2^* + ^1CAR \rightarrow ^3O_2 + ^3CAR^*$
Deactivation	$^3CAR^* \rightarrow ^1CAR + Heat$

Fonte: Adaptado do NIEMZ, 2003 [1].

Uma outra interação fotoquímica é a Bioestimulação que será discutida no tópico a seguir e que ainda apresenta muitas controvérsias [1].

### 2.5.1 Bioestimulação

Segundo Niemz [1], a bioestimulação ocorre em baixas irradiâncias e pertence ao grupo das interações fotoquímicas. No entanto o termo bioestimulação ainda não foi cientificamente bem definido. Fluências típicas de energia encontram-se na faixa de 1 – 10 J/cm<sup>2</sup>. Cicatrização de feridas e propriedades anti-inflamatórias por fonte de luz no vermelho ou infravermelho próximo, tal como laser de hélio-neônio ou laser de diodo, foram relatadas. Para Karu [21] efeitos locais de cicatrização de feridas com laser de hélio-neônio ou diodo pode ser explicado pela ação da luz em baixa intensidade na proliferação celular. A exposição de tecidos ao vermelho ou infravermelho próximo pode servir como um estímulo para o aumento de proliferação celular. Usualmente as controvérsias decorrem da incapacidade de especificar os canais fotoquímicos de potenciais reações.

### 2.6 Efeitos Térmicos

Os efeitos térmicos em tecidos biológicos ocasionados por irradiação *laser* pode resultar em três fenômenos distintos: a conversão de luz em calor, a transferência de calor e a reação do tecido. Esta última depende da temperatura e do tempo de aquecimento a que esteve sujeito o tecido [1]

A absorção da luz ocorre por excitação eletrônica. Uma das formas possíveis de decaimento das espécies excitadas é por transferência de energia para a rede tecidual, por excitação dos seus modos de vibração. Esta excitação resulta no aquecimento do tecido. Este processo de transformação de luz em calor é muito rápido ( $10^{-13} - 10^{-12}$  s) o que garante que o volume de aquecimento primário corresponda, na ausência de processos significativos de dispersão, ao volume irradiado [23]. Uma estimativa simples desse volume,  $V_p$ , pode ser obtida a partir da secção de choque do feixe laser no tecido,  $A_L$ , e do comprimento de absorção  $\alpha^{-1}$ .

$$V_p \cdot A_L = \alpha^{-1} \quad (2.19)$$

A transferência de calor através dos tecidos vai aumentar o volume aquecido, definindo o chamado volume secundário. É este volume que deve ser considerado quando se estuda a reação do tecido ao aquecimento. O processo de transferência de calor ocorre essencialmente por condução térmica. A influência da circulação sanguínea na transferência de calor no interior dos tecidos (transporte por convecção) é desprezível.

As dimensões do volume secundário podem ser aferidas através do comprimento característico de difusão de calor,  $L_D$ , e pela temperatura da fonte de calor,  $B$ , sendo esta definida por:

$$A^* \rightarrow BL_D = 2\sqrt{DT} \quad (2.20)$$

onde  $D$  é a difusibilidade térmica e  $T$  é o tempo.

Para materiais isoladores térmicos, como é o caso da água e da maioria dos materiais biológicos, o valor de  $D$  é da ordem de  $10^{-3} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ . O conhecimento do comprimento característico de difusão permite saber se a energia depositada pelo feixe de luz afeta principalmente a região irradiada ou difunde-se significativamente para além desta região. A limitação dos efeitos à região irradiada ocorre quando o comprimento  $L_D$  é inferior ao comprimento de absorção  $\alpha^{-1}$ .

Desse modo a compreensão sobre os mecanismos, interações fotoquímicas e térmicas é essencial para que se possa entender de forma mais aprofundada o que ocorre em um determinado processo como é o exemplo da Terapia Fotodinâmica, de tal forma que essa compreensão pode possibilitar o melhoramento da técnica. O entendimento dos efeitos térmicos são importantes, pois a interação da luz pode causar danos com o tecido ou meio biológico de uma forma geral, a depender da dose de luz empregada ou do tempo de exposição.

## REFERÊNCIAS

1. Niemz MH. Laser-Tissue Interactions: Biological and medical physics, biomedical engineering. 3ª ed. Springer, 2003.
- 2- Prasad PN. Introduction to Biophotonics. New Jersey. Wiley Interscience, 2003.
- 3- Dinh-Vo T. Biomedical Photonics Handbook. Tennessee-USA. Crc Press. 2003.
- 4- Zilio SC. Óptica Moderna: Fundamentos e aplicação. São Carlos: Compacta, 2009. 300 p.
5. Bagnato VS. Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde. São Paulo: Livraria da Física; 2008.
6. Kalka K, Merk H, Mukhtar H. Photodynamic therapy in dermatology. J Am Acad Dermatol. 2000;42:389-413.
7. Pass HI. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. J.Nat. Cancer Inst. 1993;85:443-456.
8. Roy SC, Pratt RH, Kissel L. Rayleigh scattering by energetic photons:Development of theory and current status. Radiation physic chemistry. 1993;41:725-738.
- 9.Huffman DR, Bohren CF. Absorption and Scattering of light by Small Particles. New York. John Wiley & Sons. 1998.
10. Ishimaru A. Electromagnetic Wave Propagation, Radiation and Scattering, Prentice Hall, New Jersey, 1991.
11. Observatório Nacional, As cores do céu. 2ªed. Rio de Janeiro.2011.
12. Beauvoit B, Chance B. Time-resolved spectroscopy of mitochondria, cells and tissues under normal and pathological conditions. Mol Cell Biochem. 1998;184 445-455.
- 13.Ishimaru A. Wave propagation and scattering in random media. New York: Academic Press, 1978.
14. Patterson, M S, Chance, B, and Wilson, B C. Time resolved reectance of transmittance for the non-invasive measurement of tissue optical properties. Appl Opt. 1989;28:2331-2336.
15. Trelles MA, et al. The action of low reactive level LASER therapy (LLLT) on mast cells: a possible pain relief mechanism examined. LASER Therapy. 1989;1:27-30.
16. Bonnett R. Chemical aspects of photodynamic therapy. Singapore: Gordon and breach Science publishers; 2000.
17. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbélik M, et al. Photodynamic therapy. J. Nat. CancerInst. 1998;90:889-905.

18. Sternberg ED, Dolphin D, Brückner C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron*. 1998;54: 4151- 4202.
19. Perussi JR. Inativação Fotodinâmica de Microrganismos. *Quim. Nova*. 2007;30:988-994.
20. Simplicio FI, Maionchi F, Hioka N. Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, Aplicações e Avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quim. Nova*. 2002;25:801-807.
21. Karu, T.I. (1987): Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *IEEE J. Qu. Electron.* QE-23, 1703–1717
22. Toyokawa H, et al. Promotive effects of far-infrared ray on full-thickness skin wound healing in rats. *Exper Biol and Med*. 2003;228:724-729.
23. Emerson RS. Estudo das Propriedades do Biospeckle e suas Aplicações [Dissertação]. São Paulo. IF-USP;2007.

### 3 INATIVAÇÃO DE MICRORGANISMO VIA *aPDT IN VITRO*

Será descrito abaixo as medidas realizadas e os resultados obtidos, proveniente dos experimentos que versarão sobre a inativação de bactérias do tipo *S. aureus*. Para esta investigação foram utilizadas cepas padrão de forma a determinar os parâmetros ótimos de inativação, para posteriormente a técnica ser aplicada em queijo de coalho que segundo a literatura [1, 2, 3, 4, 5] é um meio que registra muitas intoxicações por este tipo de agente. A *aPDT* está sendo largamente usada no controle microbiológico e existem vários trabalhos na literatura que indicam a sua grande ação contra diversos agentes patológicos [6, 7, 8, 9]. A aplicação dessa técnica ganhou força após ser observado que bactérias resistiam a antibióticos tornando a *aPDT* um potencial mecanismo de controle microbiológico [10, 11, 12].

O agente *S. aureus* se torna uma bactéria de interesse, pois há relatos de infecções em hospitais proveniente de sua ação [13], assim como, sobre a resistência de cepas a antibióticos [10]. Neste trabalho investigamos alguns parâmetros para a aplicação efetiva da técnica, como por exemplo, a concentração do fotossensibilizador (FS), a potência da luz incidente, o tempo de irradiação na amostra, a dose de luz fornecida à amostra, a diluição da bactéria (*S. aureus*) e o meio de cultura. Os melhores parâmetros foram sendo obtidos e adotados até a finalização do experimento. Para que a *aPDT* ocorra de forma eficiente é necessário que os três ingredientes que são a luz, o fotossensibilizador e o substrato biológico combinem de tal forma que possam inativar o maior número de microrganismos [14, 15, 16].

Com o intuito de analisar a eficiência da *aPDT, in loco*, foram escolhidos duas amostras de queijo de coalho, uma produzida com leite pasteurizado e a outra com leite cru, produzidos no estado de Alagoas que foram submetidos a análise de *S. aureus*. As amostras de queijos foram submetidas a tratamento com sal de Curcumina e irradiadas com luz azul em 450 nm. O experimento foi realizado em triplicata e como meio de isolamento para *S. aureus*, usou-se o Ágar *Baird-Parker*.

#### 3.1 Materiais e Método

##### 3.1.1 Análise *in vitro*

Tentando observar a inativação do microrganismo *Staphylococcus aureus* por meio da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (*aPDT*), tendo como fotossensibilizador o sal de Curcumina (PDTPharma – Ribeirão Preto – S.P.), foi testado situações experimentais com o

objetivo de encontrar as condições ótimas que mais inviabilizavam o crescimento do microrganismo. O experimento foi realizado *in vitro* e foi dividido em 4 (quatro) grupos, os quais serão descritos no decorrer deste capítulo.

O experimento foi realizado em parceria com o Laboratório de Controle e Qualidade de Alimentos da Faculdade de Nutrição da UFAL e o Laboratório de Fotônica e Fluidos Complexos do Instituto de Física da mesma Universidade. Nosso intuito consistia em observar a ação do fotossensibilizador Sal de Curcumina (oriundo da Cúrcuma ou *Curcuma Longa L.*) na ação antimicrobiana, quando este era iluminado com luz em comprimento de onda ressonante com sua banda de absorção. Neste caso a técnica empregada é denominada de Inativação Fotodinâmica *aPDT*, que vem ganhando espaço cada vez maior, para o tratamento de certas patologias não oncológicas [17, 18, 19, 20, 21, 22,23].

Foram utilizadas bactérias do tipo, *Staphylococcus aureus*, que são microrganismos Gram (+), segundo o método de coloração de Gram. As cepas usadas foram do tipo ATCC 25922 (Laborclin - Paraná) (Fig. 22) e o tempo de ativação e incubação foi de 24 horas.

**Figura 22- Cepas de *Staphylococcus aureus*.**

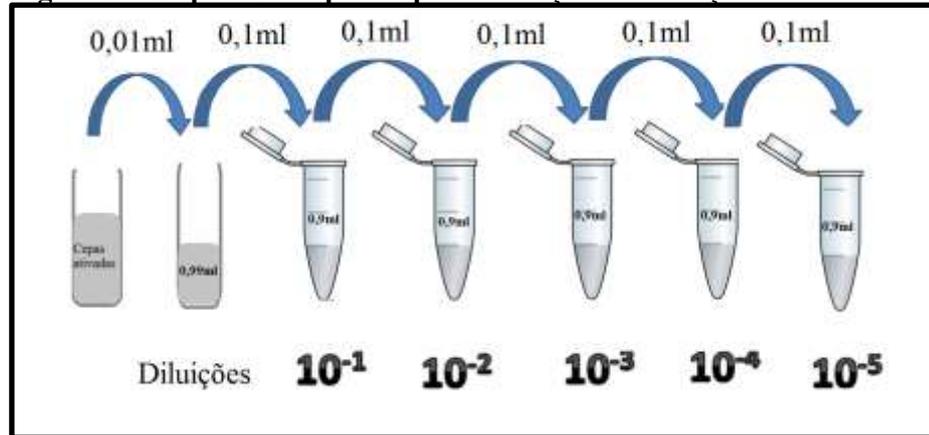


Fonte: Autor 2012

Para a utilização das bactérias que estavam congeladas em freezer foi necessário a sua ativação através de procedimento padrão em laboratório de microbiologia. Inicialmente foi preparado o meio de cultura e o meio diluente. Como meio de cultura foi utilizado o Ágar *Baird-Park* (Prodimol Biotecnologia- Belo Horizonte- MG) e o caldo BHI (*Brain Heart Infusion Broth*) (DIFCO- São Paulo- SP) e como meio diluente a Água Peptonada Tamponada (APT) (DIFCO- São Paulo- SP), conforme recomendação do fabricante. Em seguida foram ativadas as cepas de *Staphylococcus aureus*, colocando 0,1 mL da cepa em 4mL de caldo BHI e incubada em estufa a 35 °C por 24 horas.

Após a ativação da cepa, vários testes de diluição foram realizados com o intuito de observar qual diluição possibilitava uma melhor contagem do número de colônias de *S. aureus*, para posterior análise. As diluições foram feitas da seguinte forma: retirou-se 10 µL da solução que contém as bactérias ativas e colocou-se em tubo de ensaio que continha 990 µL de APT, agitou-se no vórtex (Type 16700 Mixer- 120 V- Modelo M16715- U.S.A) e depois retirou-se dessa solução 100 µL e colocou-se em outro tubo com 900 µL de APT, essa foi a primeira diluição ( $10^{-1}$ ). Para continuar a diluir, agitou-se a diluição  $10^{-1}$  no vórtex, e daí retirou-se 100 µL e colocou em outro tubo com 900 µL, agitou-se no vórtex. Essa foi a diluição  $10^{-2}$ , e assim sucessivamente, até obter a diluição desejada de  $10^{-5}$  (Fig. 23).

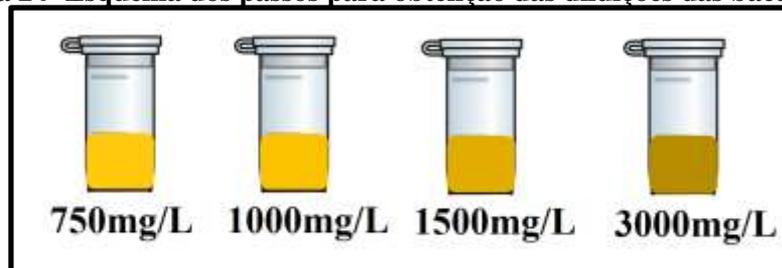
**Figura 23- Esquema dos passos para obtenção das diluições das bactérias.**



Fonte: Autor, 2012.

Foram usados dois tipos de solução, uma que já foi descrita contendo bactéria, BHI e APT e a outra com bactéria, BHI, APT e o sal de Curcumina. Para essa segunda foi adicionado uma concentração de 750, 1000, 1500 e 3000 mg/L de sal de Curcumina (Fig. 24) na concentração de 1:1, sendo usado a diluição de  $10^{-5}$  da solução que contém a bactéria.

**Figura 24- Esquema dos passos para obtenção das diluições das bactérias.**

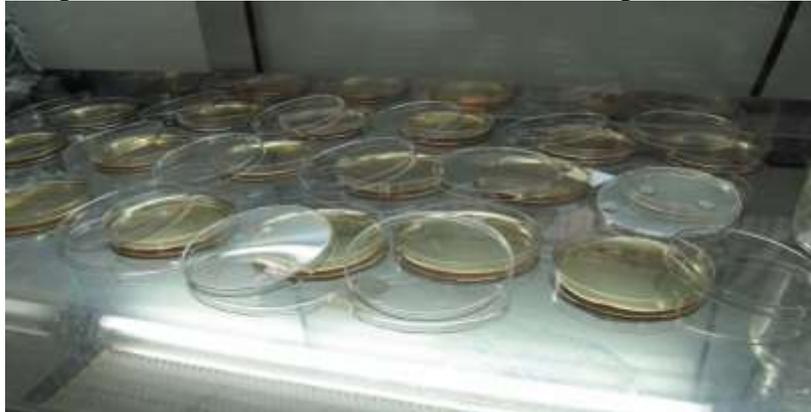


Fonte: Autor, 2012

Os quatro grupos foram designados como: CONTROLE, LUZ, CUR e PDT. No grupo CONTROLE só há bactérias, BHI e APT, no grupo LUZ, só há bactérias, BHI e APT, no entanto este grupo é submetido à irradiação por luz *LED* com comprimento de onda em 450 nm por 5, 10, 15, 20 e 30 min. O grupo CUR, apresenta o sal de Curcumina (Fotossensibilizador), as bactérias, BHI e APT, e o grupo PDT apresenta a Curcumina as bactérias, BHI e APT, porém este grupo também é submetido à irradiação por luz em 450 nm por um tempo de 5, 10, 15, 20 e 30 min.

Após os processos de irradiação foram inoculados 0,1mL de cada solução em placas de Petri (Fig. 25) com o meio de cultura Ágar Nutriente. O experimento foi realizado em triplicata.

**Figura 25- Placas de Petri e meio de Cultura Ágar Nutriente.**



Fonte: Autor, 2012.

No caso dos grupos CONTROLE e CUR, estes foram diretamente inoculados nas placas de Petri. Entretanto os grupos LUZ e PDT antes de serem inoculados, foram expostos à luz em 450 nm. Neste caso foi utilizado como fonte de luz, dois conjuntos de 3 (três) *LEDs* dispostos na vertical em paralelo com espaço entre eles para colocar o recipiente com a solução a ser irradiada. O equipamento (Biopdi - São Carlos- SP.) (Fig. 26) tem visor que possibilita saber a corrente entregue aos *LEDs* e com isso montarmos uma curva de calibração para a leitura da potência de saída, usamos para isto um medidor de potência com o sensor quadrado de 1cm<sup>2</sup> de área (Optical Power Meter 3664- HIOKI- Japan). As bactérias foram colocadas em uma pequena proveta de 1,0 cm de diâmetro e irradiadas por um tempo de 5, 10, 15, 20 e 30 min.

**Figura 26- Conjunto de LEDs emitindo em 450 nm irradiando proveta com bactérias.**



Fonte: Autor 2012.

As doses de luz usadas no experimento e as respectivas potências administradas estão descritas na tabela 6.

**Tabela 6- Doses, potências e tempos usados respectivamente.**

Dose (J/cm <sup>2</sup> )	Potência (mW)	Tempo (min)
10	151	5
19		10
29		15
39		20
58		30
13	204	5
78		30
16	258	5
98		30

Fonte: Autor, 2012.

Com a conclusão da inoculação de todos os grupos, as placas de Petri foram acondicionadas em estufa (Marte® MB155/3F) (Fig.27) em uma temperatura de 36 °C, por um tempo de 24 horas. Usou-se o método estatístico como análise dos dados para contagem das colônias de bactérias decorrido o tempo de incubação de 24 horas.

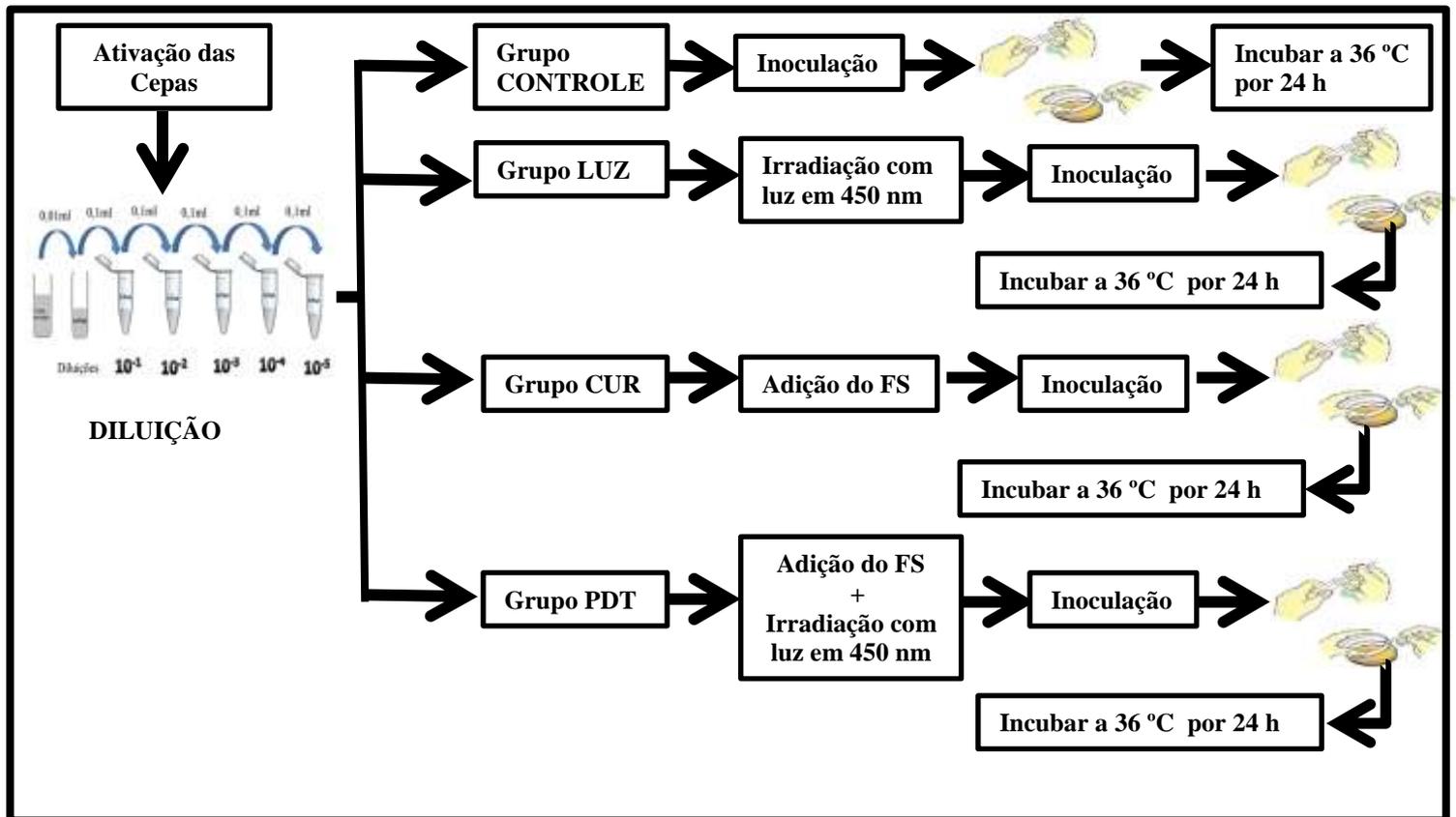
**Figura 27- Estufa a 36 °C.**



Fonte: Autor, 2012.

A seguir na Figura 28 mostraremos o diagrama esquemático do experimento.

Figura 28- Esquema do experimento com as placas de Petri.



Fonte: Autor, 2012.

### 3.1.2 Análise *in loco*

#### 3.1.2.1 Técnica de análise para *S. aureus*

A técnica de análise para *S. aureus*, foi realizada de acordo com Apha [24]. Para este trabalho foram selecionados duas amostras de queijo de coalho. O experimento foi dividido em 3 grupos de interesse a saber QCNP-CONTROLE (Queijo de Coalho produzido com leite não pasteurizado), que apenas apresentava o alimento sem nenhum tratamento; QCNP-PDT-5 – Grupo submetido ao tratamento com sal de Curcumina e irradiado em luz azul (450 nm) por 5 min; QCNP-PDT-30 – Grupo submetido as mesmas condições do grupo QCNP-PDT-5, porém neste grupo o tempo de exposição a luz azul foi de 30 min. E para a outra amostra de Queijo de Coalho produzido com leite pasteurizado (QCP) os grupos QCP-CONTROLE, QCP-PDT-5 e QCP-PDT-30, seguiram os mesmos procedimentos.

Inicialmente pesou-se 30 g de cada amostra de queijo (Figura 29: a) em balança, que posteriormente foram separadas em porções de 10 g e submetidas à análise. Neste caso para a preparação do grupo CONTROLE, tanto da amostra QCNP quanto da amostra QCP, foi

diluído 10 g de queijo em 90 mL de APT em sacos de Stomacher. Essa mistura foi homogeneizada no Stomacher por 2 min e em seguida foi feita a diluição seriada ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ). Posteriormente foram inoculados 0,1ml de cada diluição nas placas de Ágar Baird-Park. Para os grupos PDT-5 e PDT-30 min os procedimentos de diluição e homogeneização foram os mesmos. No entanto, para o tratamento com o sal de Curcumina e irradiação de luz, realizamos um procedimento antes da diluição na água peptonada tamponada. O tratamento consistia em emergir 10 g de queijo por 5 mim (tempo de pré irradiação)[10, 19, 25] em sal de Curcumina na concentração de 750 mg/L (Figura 29: b) que na sequência era exposto a luz em 450 nm, por 5 e 30 min respectivamente em tubo de ensaio (Figura 29: c). O queijo tratado era submetido a técnica de diluição e homogeneização já mencionada. Após tratar o alimento e inocular 0,1mL por plaqueamento por superfície em ágar Baird-Park, as placas de petri foram incubadas em estufa específica no tempo de 48 h para posterior contagem.

**Figura 29- Procedimentos de análise. a) queijo coalho; b) Queijo emergido em Sal de Curcumina; c) Queijo em tubo de ensaio a ser exposto em luz de 450 nm.**



Fonte: Autor, 2012.

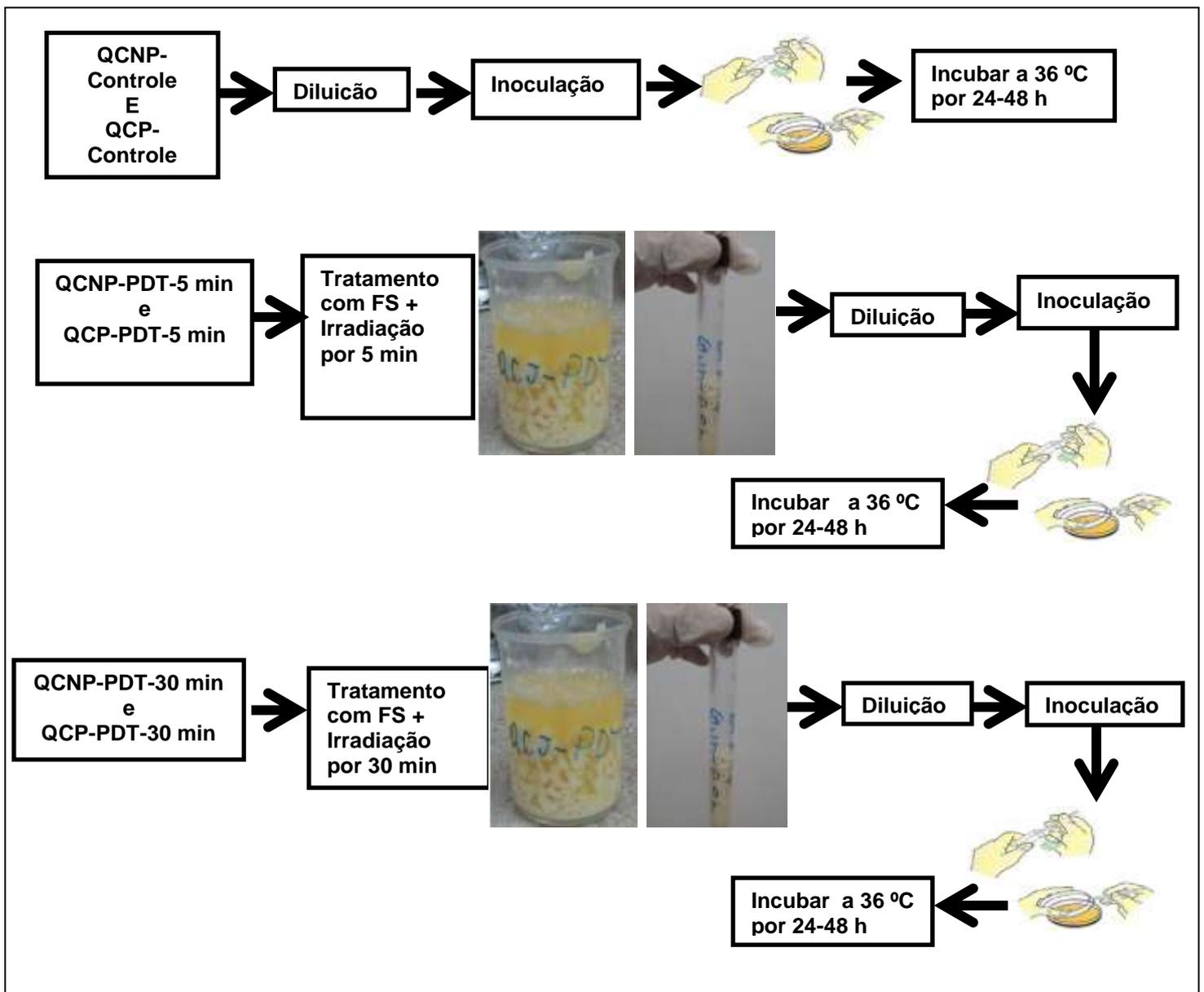
Decorrido o tempo de incubação, realizou-se a contagem das colônias. Assim para seguimento da análise foram selecionadas 3 colônias típicas de cada grupo em questão. Tais colônias foram transferidas para tubos contendo caldo BHI e Ágar TSA e posteriormente foram submetidos aos testes de coagulase e catalase respectivamente.

Para o teste de coagulase, transferiu-se 0,2 mL do caldo BHI para tubos de 10x100mm estéril, seguido de forte emulsificação. Foi adicionado 0,5 mL de Coagulase Plasma-EDTA (plasma de coelho com EDTA) a este tubo. De modo que a mistura foi feita com movimento de rotação, sem agitar os tubos. O tubo foi incubado em banho-maria a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e a mistura observada periodicamente, durante 6 horas, quanto a formação de coágulo, pois o teste é considerado positivo para *S. aureus* quando os coágulos são firme de forma que não se rompem quando o tubo é inclinado ou invertido. E para o teste de catalase, foi adicionado gotas de peróxido de hidrogênio à 3 % nos tubos de TSA inclinados. Observou-se a

ocorrência de borbulhamento imediato (teste positivo) ou não (teste negativo). O cálculo final que indica o número de colônias de *S. aureus* na amostra analisada é dada pelo número de colônias típicas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas. Temos como exemplo o caso com 35 colônias típicas, diluição de  $10^{-3}$ , fator de conversão igual a 10 e percentagem das colônias típicas confirmadas 0,66 % (3 colônias submetidas a confirmação e 2 confirmadas), resulta no cálculo:  $35 \times 10^3 \times 10 \times 0,66 = 2,31 \times 10^5$  UFC/g.

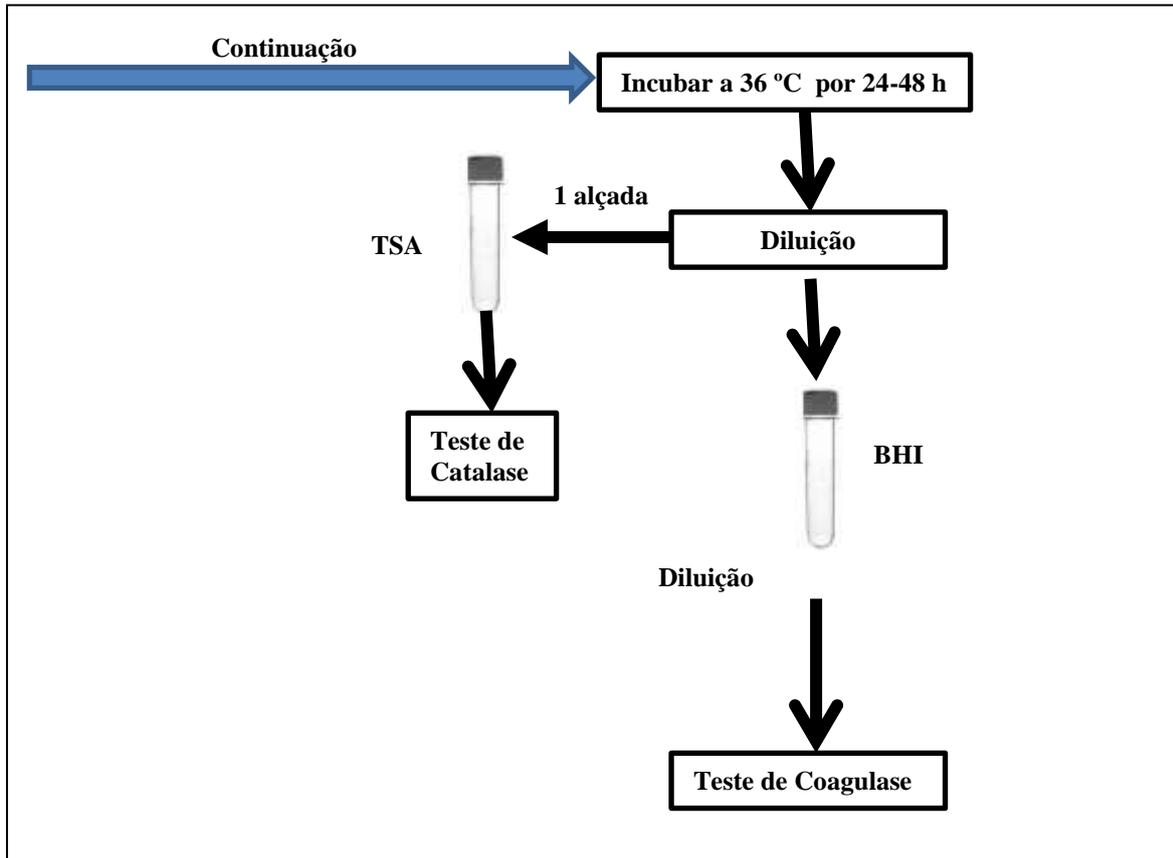
A seguir na figura 30, mostramos o esquema do experimento realizado com as amostras de queijo.

**Figura 30- Esquema do experimento com as amostras de queijo de coalho**



A técnica de análise para *S. aureus*, foi realizada de acordo com Apha [24].

**Figura 31- Esquema do experimento dos testes bioquímicos das amostras de queijo de coalho para *S. aureus***



Fonte: Autor, 2013

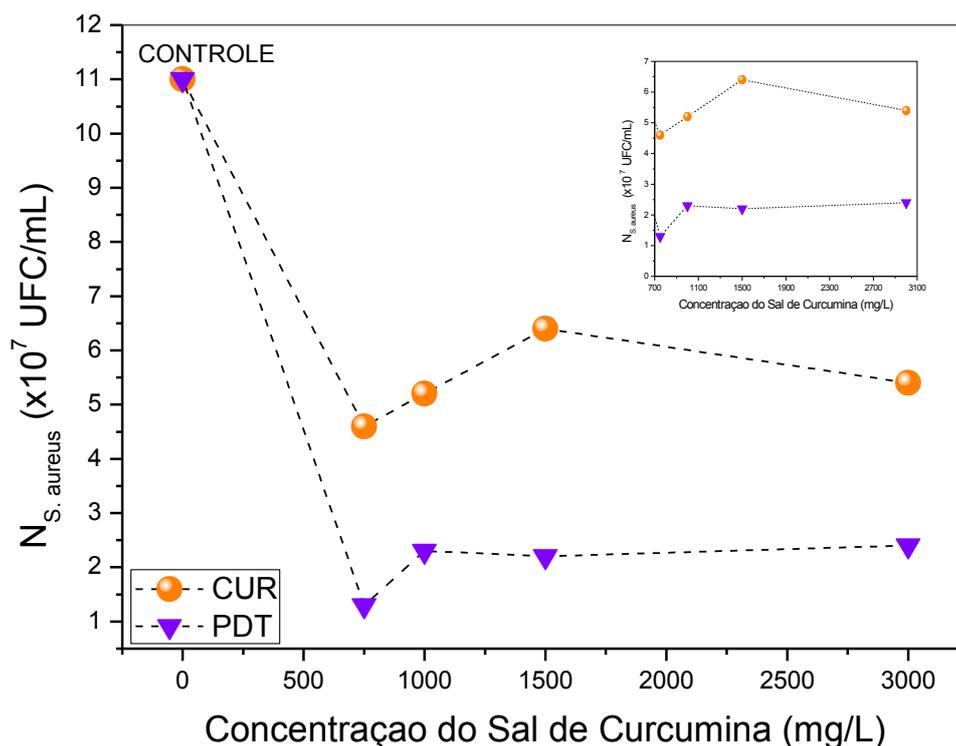
### 3.2 Maximizações dos Parâmetros: Concentração (FS), Potência (LED), Tempo de Irradiação (LED), Dose (LED), Diluição (*S. aureus*) e Meio de Cultura- Resultados e Análise.

A primeira etapa do nosso trabalho focalizou esforços em investigar qual seria a concentração do sal de Curcumina que mais inativasse as bactérias. Irradiamos os microrganismos com luz LED em 450 nm (Biopdi - São Carlos- SP) por um tempo de 5 min. Usamos quatro concentrações distintas: 750 mg/L, 1000 mg/L, 1500 mg/L e 3000 mg/L. Todas as concentrações atuaram como inibidoras do crescimento de colônias do *S. aureus*, no entanto, a concentração 750 mg/L se destaca por ser a menor delas e mostrar forte inibição tanto no grupo que só tem a adição do sal de Curcumina (CUR), quanto no grupo com uso combinado do sal de Curcumina e incidência de luz em 450 nm por 5 minutos (PDT). O ponto em 0 mg/L representa o grupo CONTROLE que mostra o número de colônias de bactérias

antes de adicionarmos o sal de Curcumina, antes de incidirmos luz ou o combinado dos dois (Fig. 32).

Percebemos que adicionando aos microrganismos apenas o sal de Curcumina, sem iluminação, este fotossensibilizador apresentou ação antimicrobiana, de forma a reduzir a população de bactérias em todas as concentrações usadas. Vários trabalhos [26, 27, 28] têm descrito a ação antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória da Curcumina. Porém, usando apenas o sal de Curcumina, observamos que sua ação antimicrobiana não é suficiente para uma redução mais expressiva dos microrganismos e isso é observado ao compararmos os grupos CUR e PDT, onde este último tem um comportamento de inativação superior.

**Figura 32- Inativação do número de colônias de *S. aureus* dos grupos CUR e PDT como função da concentração do sal de Curcumina. O destaque é dado para a análise dos grupos CUR e PDT.**



Fonte: Autor, 2012.

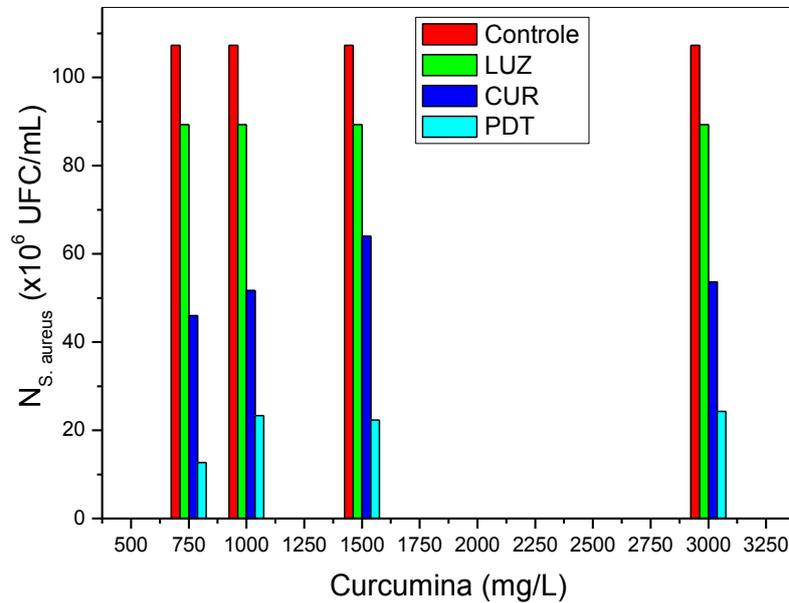
Escolhemos como concentração ideal para dar andamento a nossa pesquisa a de 750 mg/L, pois doses mais altas de FS podem causar saturação dos sítios de ligação e isso provoca uma baixa atuação da técnica, pois segundo Jackson et al [29] concentrações mais elevadas podem produzir menores efeitos fototerápicos, já que os sítios de ligação do composto às

células tornam-se saturados, logo não terão eficiência os fótons formados a partir da excitação das moléculas do FS que não se ligaram à célula-alvo. Outra questão é que o mecanismo que é adotado como o principal responsável pelo dano letal causado à bactéria por *aPDT*, que é a ação fotodinâmica, pode produzir principalmente mudanças na membrana citoplasmática e danificar o DNA [30]. O dano à membrana citoplasmática pode envolver extravasamento do conteúdo celular ou inativação dos sistemas de transporte ativo da membrana e função das enzimas [31].

Na Figura 33, apresentamos todos os grupos de interesse (CONTROLE, LUZ, CUR e PDT) em relação à concentração do fotossensibilizador e verificamos de forma global que a concentração mais baixa (750 mg/L) apresentou uma eficiência melhor do que as outras. Outro fato de interesse é que sem a aplicação da luz, já existe uma redução considerável das colônias de bactérias e essa redução foi intensificada quando se aplicou o FS com a luz (grupo PDT). A ação solitária da luz (grupo LUZ) na inativação é observada, mas é muito pequena quando comparada aos outros grupos. Enfatizamos que para este experimento o tempo de irradiação tanto no grupo PDT quanto no grupo LUZ foi de 5 minutos com luz LED em 450 nm.

Após encontrar um dos graus de liberdade que foi a concentração, o próximo passo foi definir o tempo de incidência de luz que inativasse o maior número de colônias de bactérias, que aqui será definido como o tempo de exposição. Usamos os tempos de 5, 10, 15, 20 e 30 minutos para os grupos LUZ e PDT. Analisando a figura 34 observa-se que com o aumento do tempo de exposição a irradiação influencia na inativação dos microrganismos. Na Figura 34 representamos no tempo 0 min o nosso grupo CONTROLE, que representa o 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. Incidindo luz por cinco minutos observamos no grupo PDT uma acentuada inativação de microrganismos, essa inativação continua crescendo suavemente até a iluminação final que tem a duração de 30 min.

**Figura 33- Número de colônias de *S. aureus* dos grupos CONTROLE, LUZ, CUR e PDT como função da concentração do sal de Curcumina. O tempo de incidência de luz foi de 5 min.**



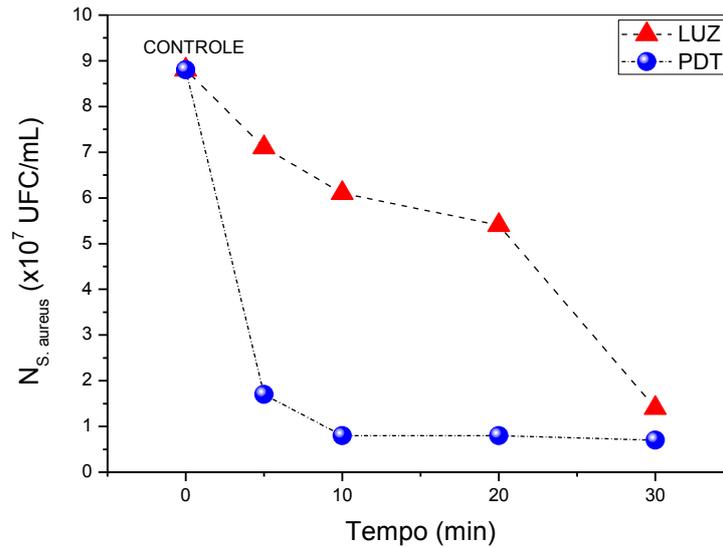
Fonte: Autor, 2012.

No grupo LUZ a inativação foi bem menor durante a iluminação de cinco minutos, mas seu comportamento crescente não foi tão suave, já que iluminando por 30 min os valores de inativação dos grupos LUZ e PDT estão muito próximos. Com 30 min de iluminação, possivelmente efeitos térmicos estão envolvidos, o que faz aumentar os efeitos de inativação em ambos os grupos. Novamente, notamos a grande ação antimicrobiana quando o sal de Curcumina e irradiação de luz estão conjugados. Pensando em observar o efeito fotoquímico da terapia fotodinâmica, como também, analisar possíveis efeitos térmicos decorrentes do tempo de exposição dos microrganismos à luz incidente, realizamos nossas medidas nos dois tempos de iluminação 5 e 30 minutos.

Com a determinação da melhor concentração e dos tempos de exposição, verificamos qual seria a melhor potência de luz incidente para maior inativação das bactérias. Foram utilizadas três potências: 151 mW, 204 mW e 258 mW. Na Figura 35 foram comparados os grupos PDT – 5 min, PDT-30 min, LUZ-5 min e LUZ-30 min. Com a potência incidente de 258 mW, constatamos uma maior inativação para os grupos PDT-5 min, PDT-30 min e LUZ-30 min. Para o grupo LUZ-5min observamos um comportamento em que a luz não influencia significativamente na inibição bacteriana e para a potência de 258 mW, houve um crescimento do número de colônias de bactérias maior que o grupo CONTROLE e possivelmente ocorreu uma bioestimulação do meio. Ao incidirmos luz numa potência de 258

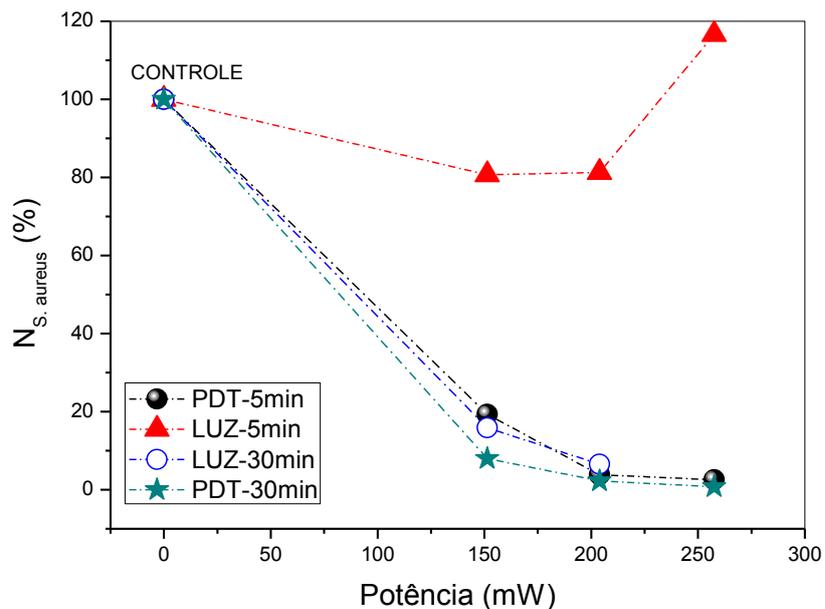
mW os grupos LUZ-30 min e PDT-5 min apresentaram comportamento semelhante, ou seja, grande inativação de bactérias. Acreditamos que a justificativa para isto se deve a efeitos térmicos envolvidos quando o tempo de exposição da luz no meio se torna considerável.

**Figura 34- Número de colônias de bactérias dos grupos LUZ e PDT como função do tempo de irradiação das amostras.**



Fonte: Autor, 2012.

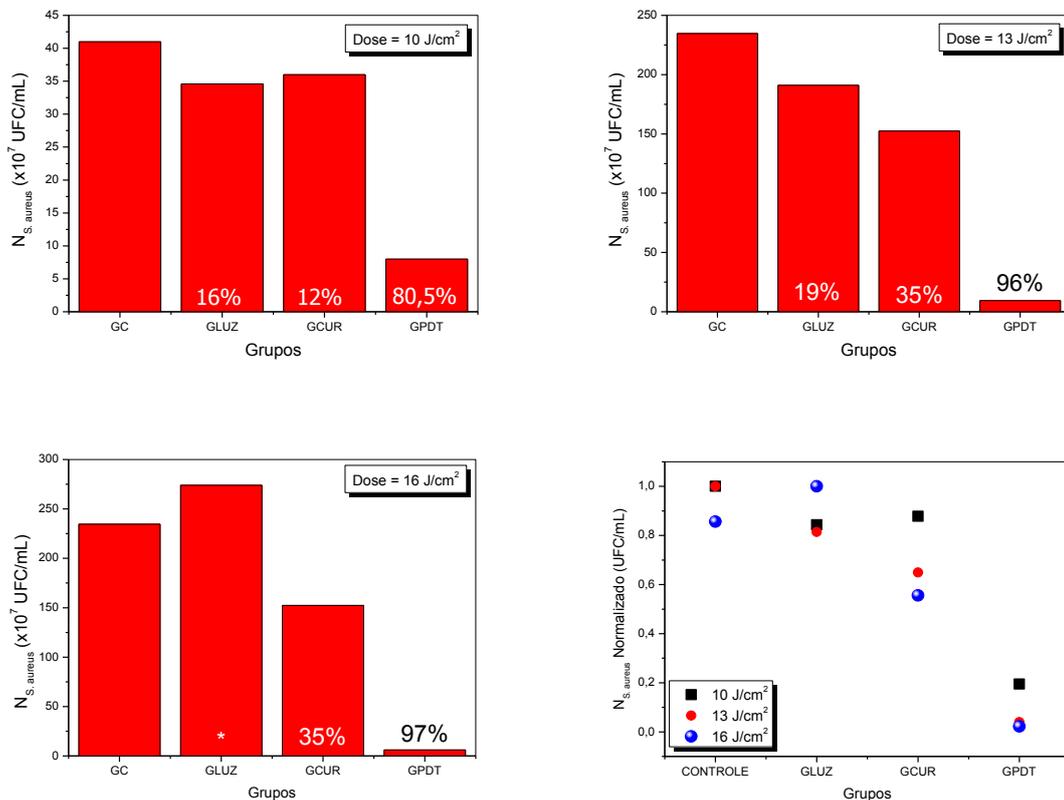
**Figura 35- Porcentagem do número de colônias de bactérias dos grupos LUZ-5min, LUZ-30min, PDT-5min e PDT-30min como função das potências incidentes nas amostras.**



Fonte: Autor, 2012.

Diante dos resultados obtidos para tempo de exposição e potência incidente no meio biológico, investigamos o efeito da dose de luz na inativação do microrganismo *S. aureus*. No conjunto de gráficos da figura 36, verificamos que a inibição de *S. aureus* para o grupo PDT foi acima de 80 % quando comparado ao grupo CONTROLE para as três doses de luz usadas de aproximadamente 10, 13 e 16 J/cm<sup>2</sup>. Nota-se também que os grupos CUR e LUZ inibiram o crescimento bacteriano, no entanto não foi tão significativo quanto o grupo PDT. As doses maiores de Luz inibiram um número maior de colônias de bactérias e, vale salientar que, na figura 36 o tempo de exposição foi de 5 minutos, só a potência da luz incidente variou.

**Figura 36- Número de colônias de *S. aureus* presentes nos grupos de monitoramento (CONTROLE, LUZ, CUR E PDT) para doses aplicadas de (a) 10 J/cm<sup>2</sup>, (b) 13 J/cm<sup>2</sup> e (c) 16 J/cm<sup>2</sup>. O gráfico (d) mostra um resumo dos resultados obtidos.**

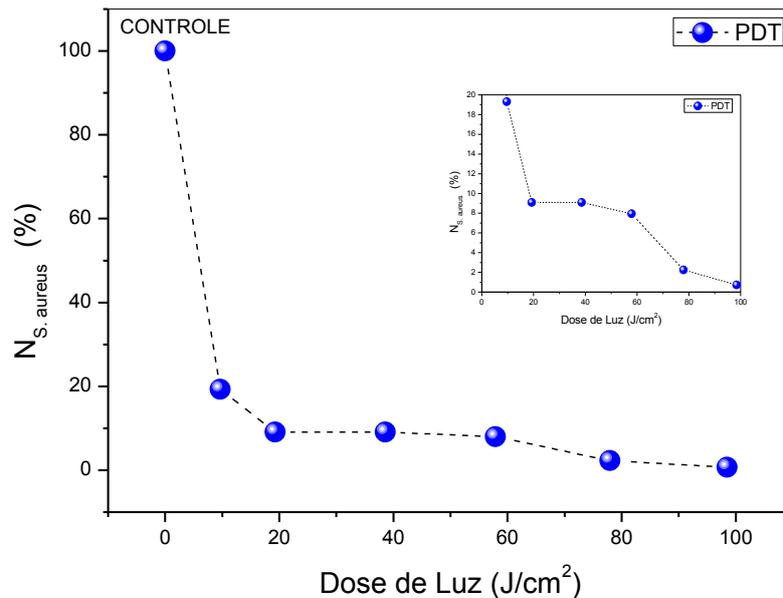


Fonte: Autor, 2012.

Na Figura 37 verificamos que quanto maior a dose de luz aplicada maior será o efeito de inativação do *S. aureus* para o grupo PDT. Neste caso efeitos térmicos também podem contribuir para aumentar a inibição junto com os efeitos fotodinâmicos, no entanto, desde as menores doses aplicadas, percebemos que a inativação ocorrida já é bastante significativa com relação ao grupo CONTROLE. A Figura 37 mostra todas as doses de luz inseridas no meio

biológico numa combinação entre as três potências de 151 mW, 204 mW e 258 mW e os dois tempos de exposição de 5 e 30 minutos.

**Figura 37- Número de colônias de bactérias (em porcentagem (%)) como função da dose de luz aplicada ao grupo PDT. O destaque é dado para análise do grupo PDT, retirando-se o grupo CONTROLE.**



Fonte: Autor, 2012.

Após encontrar os melhores valores para os parâmetros diluição, meio de cultura, concentração, potência, tempo de exposição e dose de luz entregue ao meio, seguimos com nosso trabalho no intuito de verificar a ação da *aPDT* na inativação de *S. aureus*.

### 3.3 Ação da *aPDT* na inativação de *S. aureus*

Na tabela 7, mostramos o número de colônias de bactérias, para cada grupo investigado. Todas as soluções foram inicialmente colocadas em placas de Petri e armazenadas em estufa a 36 °C por 24 horas. Após esse tempo, as placas foram retiradas e as colônias de bactérias contadas com o auxílio do contador de colônias. Nesta etapa verificou-se a influência da Potência que está diretamente ligada à dose de luz entregue ao meio biológico, em relação à inibição das colônias de bactérias. A designação P1 equivale a 204 mW e P2 equivale a 258 mW e 5 e 30 equivale ao tempo em minutos que as amostras foram expostas à iluminação.

**Tabela 7- Número de colônias de bactérias por grupo variando a dose de luz.**

	PLACA 1	PLACA 2	PLACA 3	TOTAL	MÉDIA
<b>CONTROLE</b>	236	234	234	704	234,66
<b>CUR</b>	150	137	170	457	152,33
<b>LUZ-5-P1</b>	200	176	197	573	191
<b>LUZ-30-P1</b>	16	14	16	46	15,33
<b>LUZ-5-P2</b>	256	290	276	822	274
<b>LUZ-30-P2</b>	X	X	X	X	X
<b>PDT-5-P1</b>	12	8	8	28	9,33
<b>PDT-30-P1</b>	8	2	6	16	5,33
<b>PDT-5-P2</b>	8	2	8	18	6
<b>PDT-30-P2</b>	0	3	2	5	1,66

Fonte: Autor, 2012.

O 'X' presente na tabela, representa ocorrência de contaminação nas placas do grupo LUZ-30-P2.

Com base na tabela 7, nota-se que o grupo LUZ-5-P2 apresenta um número maior de colônias de bactérias do que o grupo CONTROLE. Aqui a diferença entre os grupos foi de 39,67 em número médio de colônias. Observamos a grande semelhança das placas de Petri nas fotos da Figura 38 a seguir.

De acordo com os dados da tabela 7, nota-se que o grupo PDT-5-P1 inativou as bactérias em 95 % quando comparado ao grupo CONTROLE. Por sua vez o grupo PDT-30-P1 obteve 97,73 % e o grupo PDT-5-P2 inativou 97,44 % das colônias de bactérias. Percebe-se que a eficiência do grupo PDT-5-P2 foi semelhante ao grupo PDT-30-P1, com potência usada maior enquanto que o tempo de exposição da amostra foi apenas de 5 min. O grupo PDT-30-P2 obteve 99,30 % de inativação.

Os grupos que caracterizam apenas o uso da luz apresentam em alguns casos resultados inesperados, caso dos grupos LUZ-5-P2 e grupo LUZ-30-P1. Segundo os dados da tabela 7 é observado que o grupo LUZ-5-P2 apresenta um número de colônias maior que o grupo CONTROLE e o grupo LUZ-30-P1 obteve 93,47 % de inibição. O grupo que contém apenas o sal de Curcumina também inibe o crescimento de bactérias, foi registrada uma inibição de 35 % concordando com a literatura [30, 31] que diz ser a Curcumina uma substância antimicrobiana. A tabela 8 mostra os resultados em UFC/mL (unidade formadora de colônia por mililitro).

**Tabela 8- Número de colônias de S. aureus para cada grupo de monitoramento em UFC/mL.**

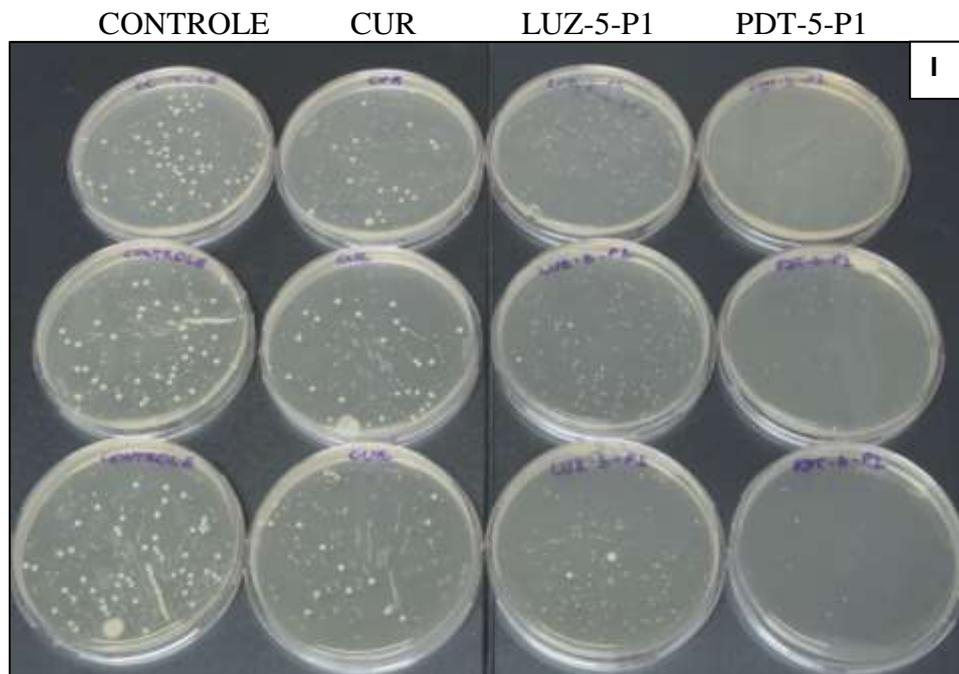
<b>GRUPO</b>	<b>QUANTIDADE (UFC/mL)</b>
<b>CONTROLE</b>	2,35 x 10 <sup>8</sup>
<b>CUR</b>	1,52 x 10 <sup>8</sup>
<b>LUZ-5-P1</b>	1,91 x 10 <sup>8</sup>
<b>LUZ-30-P1</b>	0,15 x 10 <sup>8</sup>
<b>LUZ-5-P2</b>	2,74 x 10 <sup>8</sup>
<b>LUZ-30-P2</b>	Contaminou
<b>PDT-5-P1</b>	0,09 x 10 <sup>8</sup>
<b>PDT-30-P1</b>	0,05 x 10 <sup>8</sup>
<b>PDT-5-P2</b>	0,06 x 10 <sup>8</sup>
<b>PDT-30-P2</b>	0,02 x 10 <sup>8</sup>

Fonte: Autor, 2012.

Com a análise da tabela 8, observa-se o quanto o grupo PDT de modo geral reduziu o número de colônias de bactérias. Quando comparamos o grupo PDT-5-P1 com o PDT-5-P2, a diferença entre eles foi de 1,28% e quando comparamos o grupo PDT-30-P1 com o grupo PDT-30-P2 a diferença foi de 1,27 %, logo a interpretação dos dados indica que o aumento da potência torna o potencial de inibição das colônias maior.

Nas Figuras 38 de a até d apresentamos as placas de Petri para análise visual, com as bactérias crescidas em meio de cultura Ágar Nutriente, que foram submetidas à análise da contagem das colônias em contador de colônias com caneta hidrográfica de cor vermelha ou azul e forneceram os dados das tabelas e gráficos descritos anteriormente. Em 38a observamos os grupos CONTROLE, CUR, LUZ-5-P1 e PDT-5-P1, em 38b os grupos CONTROLE, CUR, LUZ-30-P1 e PDT-30-P1, em 38c os grupos CONTROLE, CUR, LUZ-5-P2 e PDT-5-P2 e em 38d os grupos CONTROLE, CUR, LUZ-30-P2, PDT-30-P2.

**Figura 38- Placas de Petri referente aos grupos: CONTROLE, CUR, LUZ e PDT.**



**Figura 38- Placas de Petri referente aos grupos: CONTROLE, CUR, LUZ e PDT.**

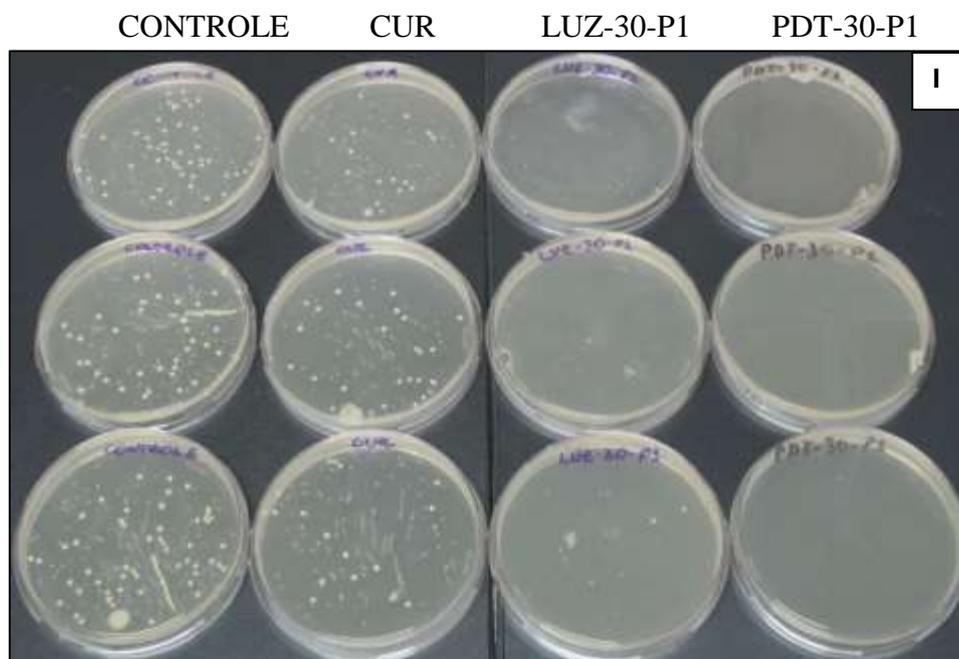


Figura 38- Placas de Petri referente aos grupos: CONTROLE, CUR, LUZ e PDT.

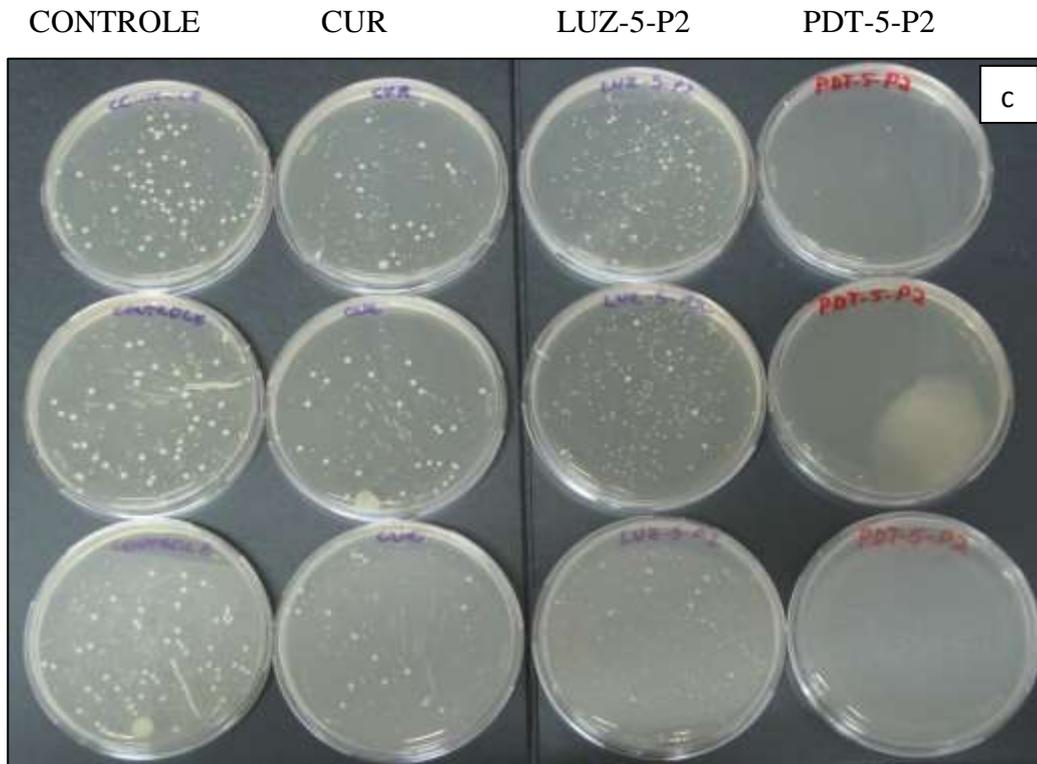
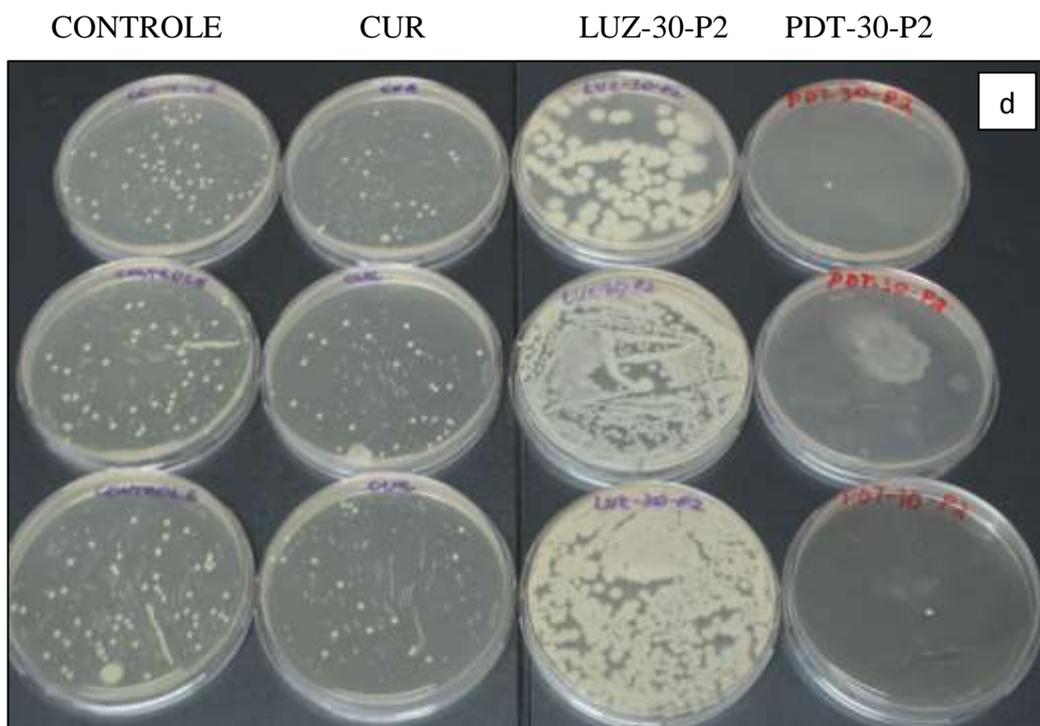


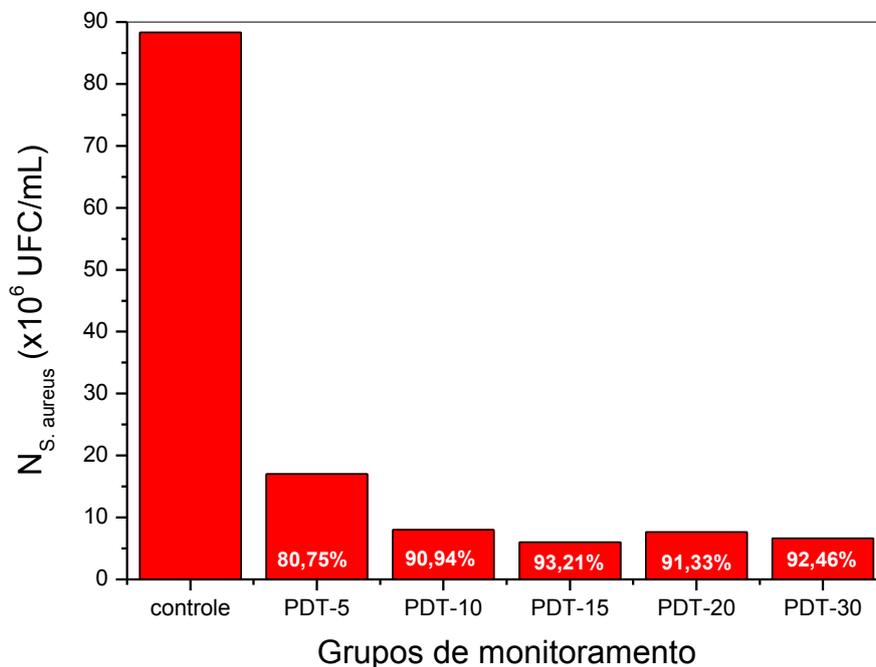
Figura 38- Placas de Petri referente aos grupos: CONTROLE, CUR, LUZ e PDT.



Após refazer as medidas até que não tivéssemos mais contaminação, montamos diversos gráficos referentes à inibição das bactérias em relação aos parâmetros, potência, tempo e dose de luz usada. Nas Figuras 39 e 40 observamos a inativação do microrganismo *S. aureus* variando o tempo de exposição de luz e mantendo fixa a potência de luz incidente em 151 mW. Fizemos uma comparação entre o grupo CONTROLE e grupos submetidos à Inativação Fotodinâmica (*aPDT*) (Fig. 39) e na Figura 40 entre o grupo CONTROLE e o grupo LUZ, para diversas doses de luz entregue ao meio biológico.

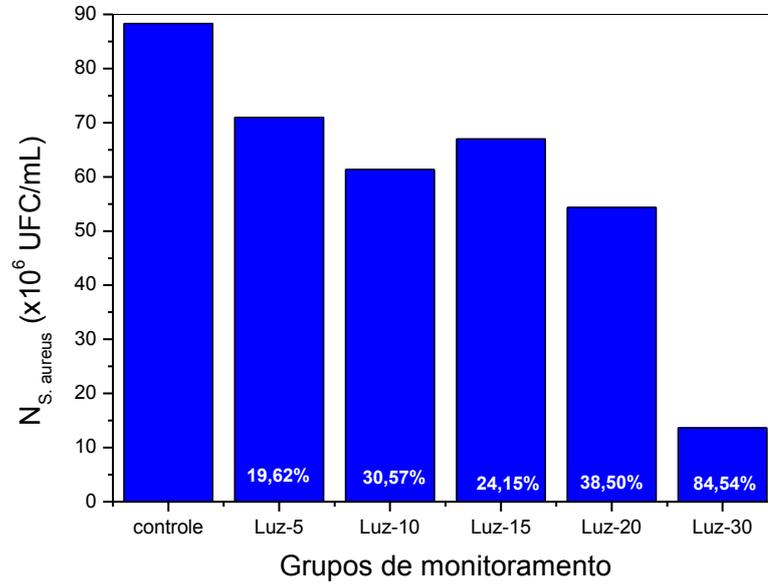
A análise das Figuras 39 e 40 indica o quanto a ação combinada inibiu as bactérias (grupo PDT), tendo uma taxa de inibição acima de 80 %, enquanto que o grupo LUZ apresenta taxas que não supera os 40 % de inibição. O grupo LUZ-30 apresentou uma taxa de 84,54 %, já que efeitos térmicos estão envolvidos. A ação antimicrobiana é indicada na figura 41, no grupo CUR, que mostra uma taxa de 60,38 % de inibição do *S. aureus*.

**Figura 39- Número de colônias de bactérias comparando os grupos CONTROLE e PDT variando o tempo de entrega da luz (5, 10, 15, 20 e 30 min) e potência fixa de 151 mW. Em destaque as porcentagens de inativação de *S. aureus***



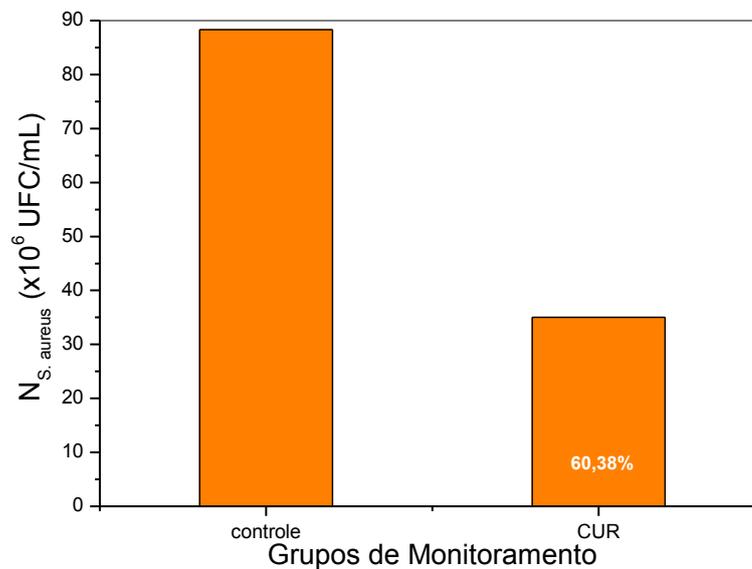
Fonte: Autor, 2012.

**Figura 40- Número de colônias de bactérias comparando os grupos CONTROLE e LUZ variando o tempo exposição (5, 10, 15, 20 e 30 min) e potência fixa de 151 mW. Em destaque as porcentagens de inativação do *S. aureus*.**



Fonte: Autor, 2012.

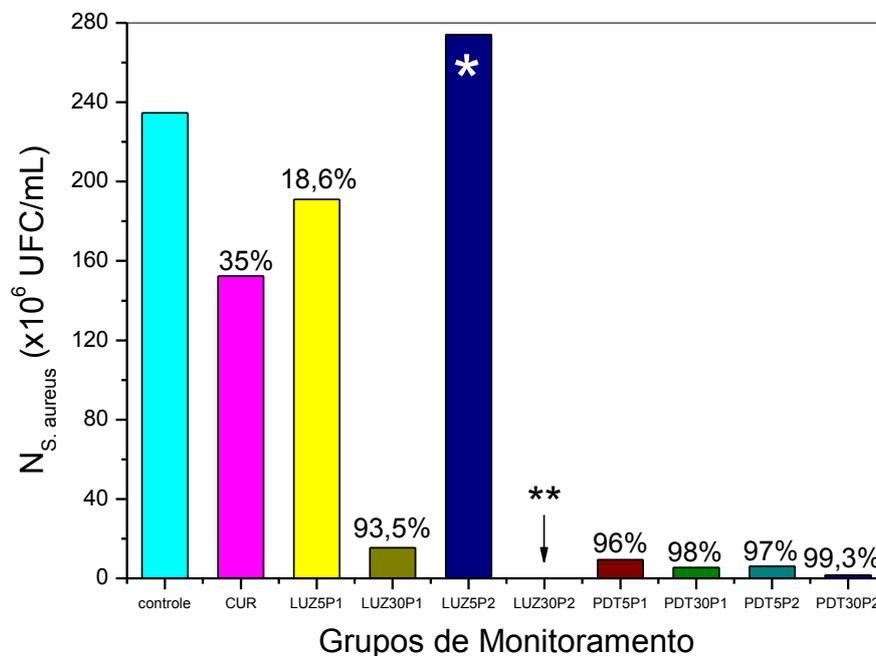
**Figura 41- Número de colônias de bactérias comparando os grupos CONTROLE e CUR. Em destaque a porcentagem de inativação do *S. aureus*.**



Fonte: Autor, 2012.

Um apanhado geral da inativação de *S. aureus* para todos os grupos estudados é mostrado na figura 42. Nota-se que a taxa de inibição foi superior a 90 % nos grupos PDT. O grupo LUZ-5-P2 apresentou um crescimento anormal das colônias, superando o grupo controle, aqui verificamos que houve uma bioestimulação, neste caso a irradiação da luz favoreceu o crescimento bacteriano. Percebemos a inativação devido ao efeito antimicrobiano do sal de Curcumina e que o aumento da dose de luz entregue ao meio biológico faz crescer a inativação dos microrganismos.

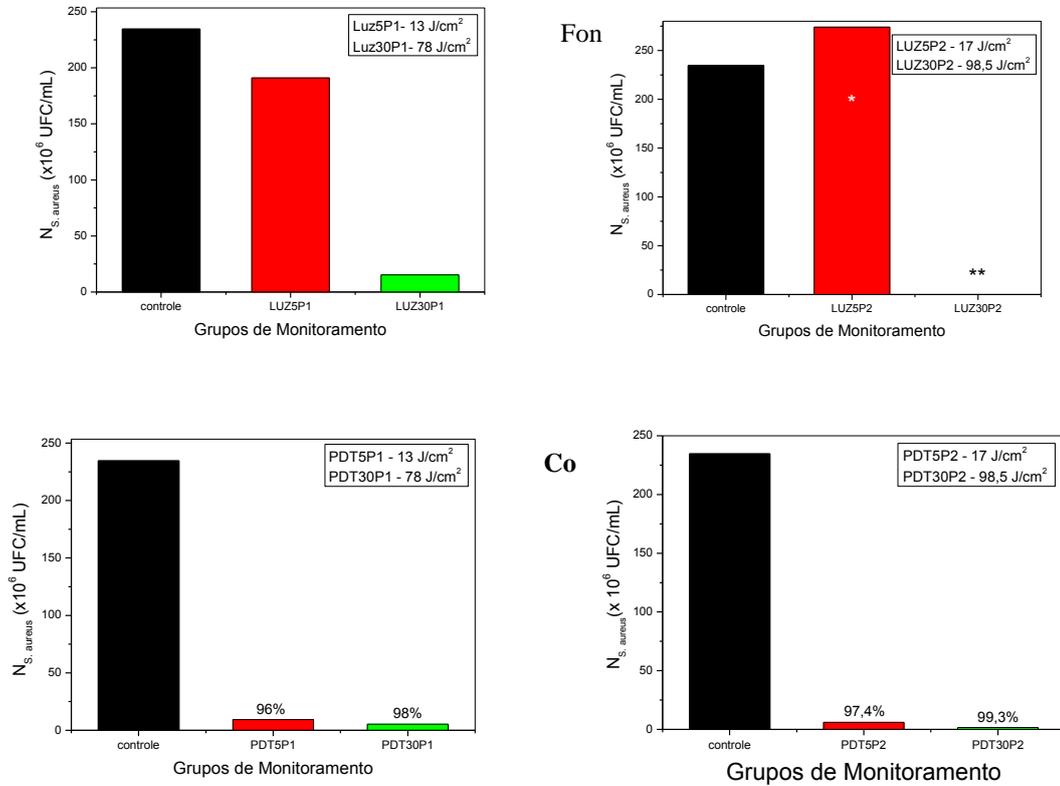
**Figura 42- Resumo da inativação de *S. aureus* para todos os grupos investigados variando a dose de luz entregue ao meio biológico. O símbolo (\*) na coluna LUZ-5-P2 indica bioestimulação e o (\*\*) na coluna LUZ-30-P2 indica contaminação.**



Fonte: Autor, 2012.

De acordo com a Figura 43 a seguir, quanto maior for a dose de luz e a potência usada, maior será a taxa de inibição das bactérias. E em todos os testes o grupo CUR também apresentou ação antimicrobiana. O grupo LUZ inativou *S. aureus*, mas não tão expressivamente quanto o grupo PDT.

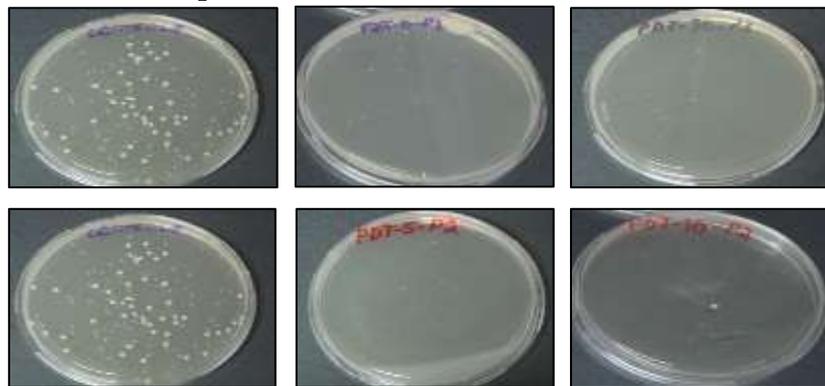
**Figura 43- Inativação de *S. aureus* para as doses de luz entregue ao meio biológico: 13 J/cm<sup>2</sup>, 17 J/cm<sup>2</sup>, 78 J/cm<sup>2</sup> e 98,5 J/cm<sup>2</sup>. Só para grupo LUZ (a) e só para grupo PDT (b). O símbolo (\*) indica bioestimulação e o (\*\*) indica contaminação.**



Fonte: Autor, 2012.

Para visualizarmos a influência da dose de luz na ação antimicrobiana, quando comparamos o grupo controle com os grupos PDT, apresentamos as fotos das placas de Petri contidas na figura 44.

**Figura 44- Comparativo das placas de petri dos grupos CONTROLE e PDT com relação à potência e dose de luz irradiada.**



Fonte: Autor, 2012.

### 3.4 Inativação de microrganismos via *aPDT in loco*

#### 3.4.2 Análise dos resultados para *S. aureus*.

Para a contagem de *S. aureus* nos grupos testados, uma sequência de passos foram seguidos. A seguir na tabela 9 apresenta-se a média aritmética das colônias típicas presentes nas placas de Petri analisadas.

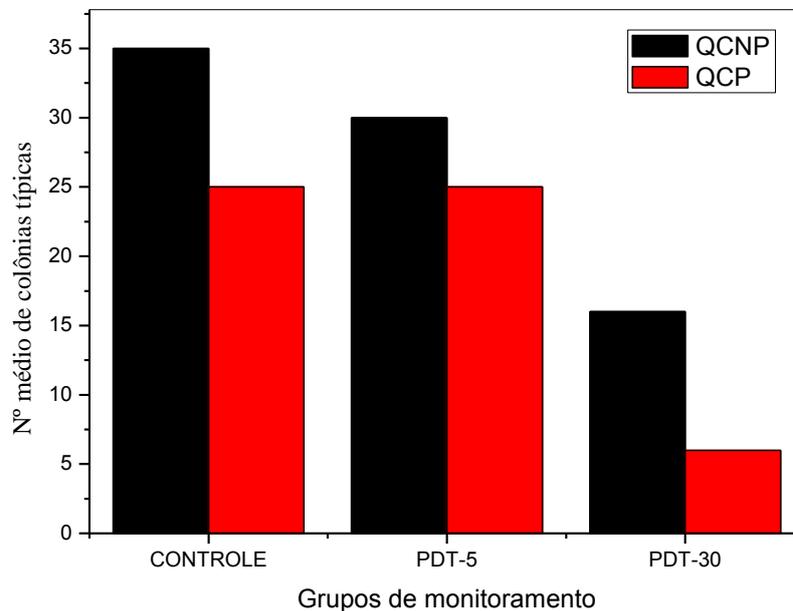
**Tabela 9- Grupos testados e valor médio de suas respectivas colônias típicas.**

	QCNP* <sup>1</sup>	QCP
<b>Controle</b>	35	25
<b>PDT 5</b>	30	25
<b>PDT30</b>	16	6

Fonte: Autor, 2012.

\*1 Média aritmética da contagem em triplicata.

**Figura 45- Número médio de colônias típicas por amostra e grupo testado**



Fonte: Autor, 2012.

De acordo com a tabela 9 nota-se que em relação as colônias típicas os grupos PDT-5 e 30 min dos dois tipos de queijo apresentaram uma redução do número de colônias.

Os testes de catalase deram positivos. E em relação ao teste da coagulase, foi observado que em alguns tubos houve coágulo enquanto que em outros não ocorreu. Para este

experimento foram usadas três colônias típicas para confirmação da coagulase. Segue abaixo o cálculo final do número de colônias de bactérias por grama, após os testes bioquímicos de catalase e coagulase:

**TABELA 10- Número de colônias de bactérias de *S. aureus* por grama (UFC/g), após testes bioquímicos.**

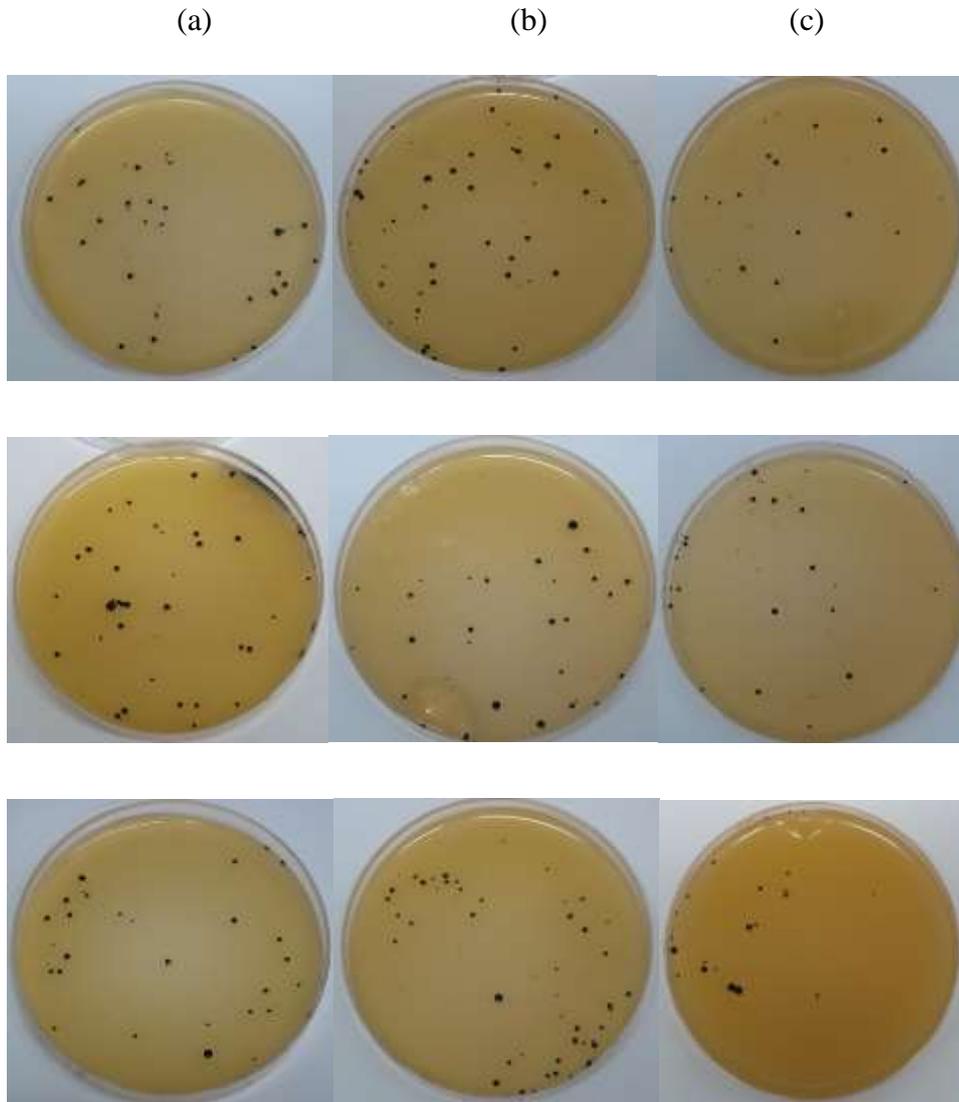
	QCNP	QCP
<b>Controle</b>	2,31x10 <sup>5</sup> UFC/g	0,825x10 <sup>5</sup> UFC/g
<b>PDT 5</b>	3,0x10 <sup>5</sup> UFC/g	< 10 UFC/g
<b>PDT30</b>	1,6x10 <sup>5</sup> UFC/g	< 10 UFC/g

Fonte: Autor, 2012.

Nos casos dos grupos QCP PDT 5 e 30 minutos não houve crescimento de colônias de *S. aureus*. Quando ocorre este fato o número de colônias é indicado como sendo < 10 UFC/g.

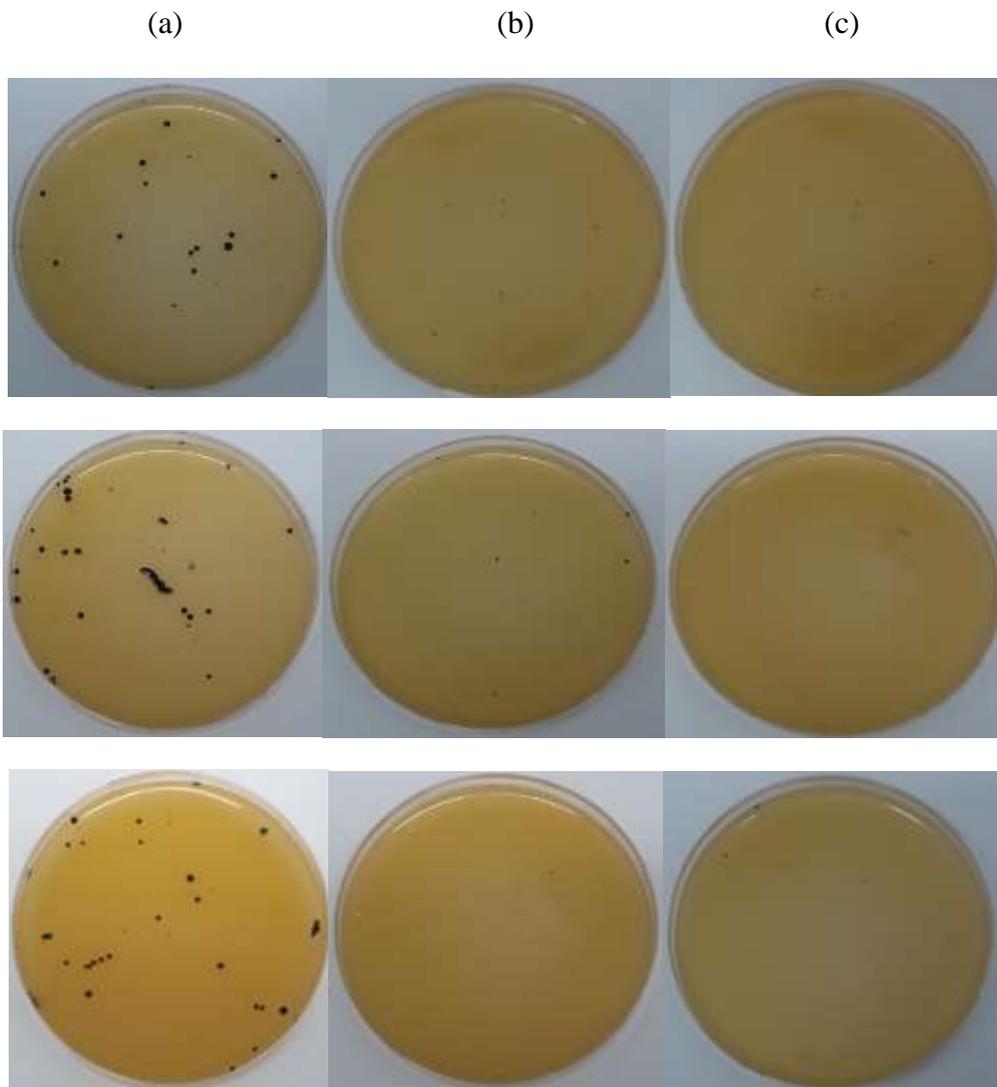
Observando os dados acima da tabela 10, constatamos que ao aplicar a técnica da a PDT no alimento, o número de bactérias foi reduzido nos dois tipos de amostra. No caso do grupo QCNP-PDT-30 observa-se uma redução acima de 30 %, enquanto que no grupo QCNP-PDT-5 o número de colônias foi maior que o grupo controle caracterizando uma Bioestimulação. Já nos grupos QCP-PDT-5 e QCP-PDT-30 o número de colônias foi menor que o grupo controle indicando inativação dos microrganismos. Por sua vez ao compararmos os grupos QCNP-CONTROLE E QCP-CONTROLE nota-se que o grupo QCP-CONTROLE houve um crescimento de colônias menor do que o grupo QCNP-CONTROLE e uma das possíveis razões para isso é que o queijo QCP deve ser processado com condições higiênico-sanitária melhores do que o queijo QCNP, e ainda, pelo fato do leite empregado ser pasteurizado no caso da amostra QCP. Na Figura 46 e 47 apresenta-se as fotos das placas de Petri com os grupos analisados.

**Figura 46- Placas de Petri com as colônias de bactérias, que foram submetidas aos testes bioquímicos. Grupos: a) QCNP-CONTROLE, b) QCNP-PDT-5, c) QCNP-PDT-30.**



Fonte: Autor, 2012.

**Figura 47- Placas de Petri com as colônias de bactérias, que foram submetidas aos testes bioquímicos. Grupos: a) QCP-CONTROLE, b) QCP-PDT-5, c) QCP-PDT-30**



Fonte: Autor, 2012.

## REFERÊNCIAS

1. Feitosa T, et al. Aspectos Higiênicos e sanitários do queijo tipo “coalho” do estado do Ceará. *Ciência Agrônômica*, Fortaleza. 1985; 16:27-32.
2. Pereira ML, et al. Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning. *Journal of Food Protection*, Des Moines. 1996;59:559-561.
3. Ikeda T, et al. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington. 2005;252:267-272.
4. Kérouanton A, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam. 2007: 1-7.
5. Alcarãs LE, et al. Detección de *Staphylococcus aureus* spp. en manipuladores de alimentos. *La Alimentación Latinoamericana*, Buenos Aires. 1997; 219:44-47.
6. Simone FGV, et al. Photodynamic inactivation of *S.aureus* and *Escheria coli* biofilms by malachite green and phenothiazine dyes: An in vitro study. *Archives of oral Biology*. 2012
7. Ishikawa SI, et al. Photodynamic antimicrobial activity of avian eggshell pigments. *FEBS Letters*. 2010;770-774.
8. Hegge AB, Bruzell E, Kristensen S, Tonnesen HH. Photoinactivation of staphylococcus epidermidis biofilms and suspensions by the hydrophobic photosensitizer curcumin- Effect of selected nanocarrier studies on curcumin and curcuminoides XLVII. *Eup Journ of Pharmac Sci*. 2012;47:65-74.
9. Lim ME, Lee YL, Zhang Y, Chu JJH. Photodynamic inactivation of viruses using upconversion nanoparticles. *Biomaterials*. 2012;33:1912-1920.
10. Bangnato VS. *Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde*. São Paulo: Livraria da Física; 2008.
11. Caminhos DA, Durantini EM. Photodynamic inactivation of *Escherichia Coli* immobilized on agar surfaces by a tricationic porphyrin. *Bioorganic & Med Chem*. 2006;14:4253- 4259.
12. Alvarez MG, Gómez ML, Mora SJ, Milanesio ME, Durantini EN. Photodynamic inactivation of *cândida albicans* using bridged polysilsesquioxane films doped with porphyrin. *Bioorgan & Med Chem*. 2012;20:4032- 4039.
13. Santos AL, et al. *Stapylococcus aureus*: Visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Bras. Pastol. Med. Lab*. 2007;43:413-423.
14. Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochemical and Photobiology Sciences*. 2004;3:412-418.

15. Gonzales FP, Maisch T. Photodynamic inactivation of controlling *candida albicans* infections. *Brit Mycolo Soc.* 2012;116:1-10.
16. Ragas X, et al. Photodynamic inactivation of *Acinetobacter baumannii* using phenothiazinium dyes: In vitro and in vivo studies. *Lasers in Surg and Med.* 2010;42:384-390.
17. Hayek RRA, Araujo NS, Gioso MA, Ferreira J, Baptista-Sobrinho CA, Jr Yamada AM, et al. Comparative Study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dog. *Journal of Periodontology.* 2005;76:1275-1281.
18. Oliveira RR, et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy in the No-Surgical Treatment of Aggressive Periodontitis: A Preliminary Randomized Controlled Clinical Study. *Journal of Periodontology.* 2007;78:965-973.
19. Perussi JR. Inativação Fotodinâmica de Microrganismos. *Quim. Nova.* 2007;30:988-994.
20. Prates RA, et al. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B.* 2007;86:70-76.
21. Sigusch BW. et al. Full-Mouth Antimicrobial Photodynamic Therapy in Fusobacterium nucleatum-Infected Periodontitis Patients. *Journal of Periodontology.* 2010;81:975-981.
22. Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochemical and Photobiology Sciences.* 2004;3:412-418.
23. Gad, F.; Zahra, T.; Hasan; T.; Hamblin, M. R.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**;4: 2173.
24. Apha. Standard methods for the microbiological examination of dairy products. 17<sup>th</sup> ed. American Public Health Association Washington, D.C. 2004.
25. Prasad PN. Introduction to Biophotonics. New Jersey. Wiley Interscience, 2003.
26. Abe Y, et al. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol Res.* 1999;39:41-47.
27. Literata A, et al. Regulation of pro-inflammatory cytokine expression by Curcumin in hyaline membrane disease (HDM). *Life Sci.* 2001;70:253-267.
28. Ramsewak RS, et al. Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumins I-III from *Curcuma longa*. *Phytomedicine.* 2000;7:303-8.
29. Jakson Z, et al. Killing of the Yeast and Hyphal Forms of *Candida albicans* Using a Light-Activated Antimicrobial. *Agent . Lasers Med Sci.* 1999;14:150-157.
30. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic Therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease ? *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004; 3:436-450.

31. Caminos DA, Spesia MB, Durantini EN. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by novel meso-substituted porphyrins by 4-(3-N,N,N-trimethylammoniumpropoxy)phenyl and 4-trifluoromethylphenyl groups. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2006; 5:56-65.

## 4 CONCLUSÃO

Diante do que foi exposto na seção 3, mediante a análise dos resultados podemos extrair as seguintes conclusões.

Dentre as concentrações testadas, destaca-se a concentração de 750 mg/L, que se mostrou mais eficiente na inativação microbiana, tanto no grupo (CUR) que só apresentava o sal de Curcumina quanto no grupo (PDT) que combinava o sal de Curcumina com incidência de luz em 450 nm. As outras concentrações que foram 1000 mg/L, 1500 mg/L e 3000 mg/L, também atuaram como agentes antimicrobianos em colônias de *S. aureus*.

A ação fotodinâmica foi observada quando comparou-se os grupos CUR, LUZ e PDT. Neste caso observamos que apenas o uso da luz ou do sal de Curcumina não apresentou uma ação significativa na morte de bactérias. Sendo que a intensificação da inativação só foi observada quando usou-se o fotossensibilizador combinado com luz em 450 nm.

A ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica foi superior a 80%, chegando até 99,3% de inativação de cepas padrão de bactérias do tipo *Staphylococcus aureus*, quando comparado os grupos PDT com o grupo CONTROLE.

Para as doses de 10 J/cm<sup>2</sup>, 13 J/cm<sup>2</sup>, 16 J/cm<sup>2</sup>, 17 J/cm<sup>2</sup>, 78 J/cm<sup>2</sup> e 98, 5 J/cm<sup>2</sup> a inibição do microrganismo estudado foi respectivamente de 80, 5%; 96%; 97%; 97, 4% ; 98% e 99, 3% . O que significa compreender que os resultados foram bastante expressivos referente ao potencial antimicrobiano da técnica. No que concerne às doses de luz testadas, notamos que o seu aumento tornava a inativação dos microrganismos mais eficiente.

Em relação aos tempos testados de 5, 10, 20 e 30 min, os de 5 e 30 min foram escolhidos como os tempos de interesse, pois no caso do tempo de 5 min a ação antimicrobiana já apresentava eficiência e, no caso de 30 min, poderíamos observar a ação de efeitos térmicos.

Observamos efeitos térmicos em alguns grupos que eram irradiados apenas por luz no tempo de 30 min quando comparados com o grupo PDT-30, percebemos um aquecimento da amostra que favoreceu a morte microbiana. Efeitos fotoquímicos também foram observados em grupos (LUZ-5) quando irradiados por 5 min, apresentando um crescimento anormal das

colônias, superando o grupo controle, aqui verificamos que houve uma bioestimulação, neste caso a irradiação da luz favoreceu o crescimento bacteriano.

Os parâmetros ótimos para a inativação de cepas de bactérias *S. aureus* foram: Concentração de 750mg/L, diluição de  $10^{-5}$ , tempo de exposição de 30 min, potência de 258 mW, dose de luz entregue o meio biológico de 98 J/cm<sup>2</sup>, meio de cultura Agar Nutriente, concentração bactéria/meio diluidor de 1:1, tempo de incubação e ativação de 24 h.

Ao aplicarmos a técnica da *aPDT* no queijo coalho, apenas a diluição e o meio de cultura não foram adotados, pois estes foram específicos para as cepas. A análise em alimentos requeria outra diluição e um meio de cultura mais seletivo. O número de bactérias foi reduzido nos dois tipos de amostra, tanto nos grupos PDT-5 quanto PDT-30. No caso do grupo QCNP-PDT-30 a redução foi acima de 30%, e nos grupos QCP-PDT-5 e QCP-PDT-30 o número de colônias foi  $< 10$  UFC/g, o que está bem abaixo do que o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento e da Saúde, estabelece como limite máximo permitido ( $10^3$  UFC/g).

Ao compararmos os grupos QCNP-CONTROLE com o grupo QCP-CONTROLE, observou-se que o grupo QCNP-CONTROLE apresentou um número maior de colônias de bactérias. Neste caso uma das possíveis causas para tal diferença é o fato que o queijo QCP deve ser processado com condições higiênico-sanitárias melhores do que o queijo QCNP e o leite usado para a fabricação do queijo QCP foi pasteurizado.

Logo a Terapia Fotodinâmica antimicrobiana, mostrou ser uma técnica com grande potencial para a inativação de *S. aureus* tanto no estudo *in vitro* quanto no estudo *in loco*. Os parâmetros que compõe a técnica foram obtidos e otimizados. No que concerne a aplicação da técnica no alimento os resultados foram satisfatórios.

## REFERÊNCIAS

- Abe Y, et al. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol Res.* 1999;39:41-47.
- Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2001;74:656- 669.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (Brasil). Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 2 jan. 2001. p. 1-54.
- Aggarwal, et al. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC.: Anticancer potencial of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2003;23:363-398.
- Akhmanov SA, Cherniaeva EB. Photodynamic action of laser emission on biomolecules and cells. The mechanisms of photodynamic action at the molecular and cell levels. *Modern problems of laser physics.* 3ª ed. 1990.
- Alcarãs LE, et al. Detección de *Staphylococcus aureus* spp. en manipuladores de alimentos. *La Alimentación Latinoamericana*, Buenos Aires. 1997; 219;44-47.
- Alvarez MG, Gómez ML, Mora SJ, Milanesio ME, Durantini EN. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* using bridged polysilsesquioxane films doped with porphyrin. *Bioorgan & Med Chem.* 2012;20:4032- 4039.
- Apha. Standard methods for the microbiological examination of dairy products. 17<sup>th</sup> ed. American Public Health Association Washington, D.C. 2004.
- Arvola T, et al. Rectal bleeding in infancy: clinical, allergological, and microbiological examination. *Pediatrics*, Evanston. 2006;117:760-768.
- Atieh MA. Photodynamic therapy as an adjunctive treatment for chronic periodontitis: a meta-analysis. *Lasers Med. Sci.* 2010;25:605–613.
- Bagnato VS. Laser e suas aplicações em Ciência e Tecnologia. Livraria da Física. 1 ed. São Paulo-SP. 2008.
- Bagnato VS. Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde. São Paulo: Livraria da Física; 2008.
- Bastos MSR, et al. Inspeção em uma indústria produtora de queijo tipo coalho no estado de Ceará, visando à implantação das boas práticas de fabricação. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 57, p. 130-136, 2001.
- Beauvoit B, Chance B. Time-resolved spectroscopy of mitochondria, cells and tissues under normal and pathological conditions. *Mol Cell Biochem.* 1998;184 445-455.
- Bertoloni G, B. Salvato B, Dall'Acqua M, Vazzoler M, et al. Hematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Streptococcus faecalis*. *Photochem. Photobiol.* 1984; 39:811–816.

- Bhatia A, Zahoor S. *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: A Review. Journal of Clinical and Diagnostic Research, Delhi. 2007;1:188-197.
- Bonnett R. Chemical aspects of photodynamic therapy. Singapore: Gordon and Breach Science publishers; 2000.
- Bonnett R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. Chem Soc Rev.1995; 24:19-33.
- Borges MF, et al. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no estado do Ceará, Brasil. Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Curitiba. 2003; 21:31-40.
- Brugnera Jr A, et al. Laserterapia aplicada à clínica odontológica. São Paulo: Santos, 2003:78.
- Caminhos DA, Durantini EM. Photodynamic inactivation of *Escherichia Coli* immobilized on agar surfaces by a tricationic porphyrin. Bioorganic & Med Chem. 2006;14:4253- 4259.
- Caminhos DA, Spesia MB, Durantini EN. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by novel meso-substituted porphyrins by 4-(3-N,N,N-trimethylammoniumpropoxyphenyl) and 4-(trifluoromethylphenyl) groups. Photochem. Photobiol. Sci. 2006; 5:56-65.
- Carcoso HFT, et al. Production of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. Letters in Applied Microbiology, Oxford. 1999; 29:347-349.
- Catão RMR, et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. RBAC.2010: 42:9-14.
- Dahl TA. *et al.*, Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. Arch. Microbiol.1989;151:183–185.
- Di Mario F, et al. A curcumin-based 1-week triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* infection: something to learn from failure? *Helicobacter*. 2007;12:238–243.
- Dinh-Vo T. Biomedical Photonics Handbook. Tennessee-USA. Crc Press. 2003.
- Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korblik M, et al. Photodynamic therapy. J. Nat. CancerInst. 1998;90:889–905.
- Dougherty TJ, Mang TS. Photochem. Photobiol. 1987;46:67.
- Emilio CR. Comparação da eficácia do ácido 5-aminolevulínico com a de seu metil éster utilizando-se a terapia fotodinâmica no tratamento de carcinoma espinocelular felino [Tese]. São Paulo: IPEN, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo; 2008.
- Endo Y, et al. Phage conversion of exfoliative toxin A in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. Veterinary Microbiology, Amsterdam. 2003;96:81-90.

Feitosa T, et al. Aspectos Higiênicos e sanitários do queijo tipo “coalho” do estado do Ceará. *Ciência Agrônômica, Fortaleza*. 1985; 16:27-32.

Feitosa T, et al. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*. 2003; 23:162-165.

Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K., Doucette S, Marcantonio RC, Boussios, CI, Kent R, Goodson JM, Tanner ACR, Soukos NS. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J. Periodontal. Res.* 2009;4:751–759.

Foot CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol.* 1991;54:659.

Franco BDGM, Landgraff M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2000.

Frazier WC, Westhoff DC. *Microbiologia de los Alimentos*. 4ª ed. Zaragoza:Acirbia, 2000.

Fueyo JM. et al. Relationships between toxin gene content and genetic background in nasal carried isolates of *Staphylococcus aureus* from Asturias, Spain. *FEMS Microbiology Letters, Amsterdam*. 2005; 243:447-454.

Gad F, Zahra T, Hasan T, Hamblin MR. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48:2173 – 2178.

Gad, F.; Zahra, T.; Hasan; T.; Hamblin, M. R.; *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;4: 2173.

Garcez AS. Laser em baixa intensidade associado a fotoabsorvedor para redução bacteriana intracanal comparado ao controle químico [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2002.

Gill SR. et al. Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. *Journal of Bacteriology, Washington*. 2005;187:2426-2438.

Gonzales FP, Maisch T. Photodynamic inactivation of controlling *candida albicans* infections. *Brit Mycolo Soc.* 2012;116:1-10.

Griffiths MA, Wren BW, Wilson M. Killing of methicillin-resistant staphylococcus aureus in vitro using aluminium disulphonated phthalocyanine, a light-activated antimicrobial agente. *Journ antimicrobial Chemother.* 1997;40:873-876.

Gutknecht N, Eduardo C. P. A odontologia e o laser: atuação do laser na especialidade odontológica. São Paulo: Quintessence, 2004. p.19-23.

Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic Therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease ? *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004; 3:436-450.

Hayek RRA, Araujo NS, Gioso MA, Ferreira J, Baptista-Sobrinho CA, Jr Yamada AM, et al. Comparative Study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dog. *Journal of Periodontology*. 2005;76:1275-1281.

Hegge AB, Bruzell E, Kristensen S, Tonnesen HH. Photoinactivation of staphylococcus epidermidis biofilms and suspensions by the hydrophobic photosensitizer curcumin- Effect of selected nanocarrier studies on curcumin and curcuminoides XLVII. *Eup Journ of Pharmac Sci*. 2012;47:65-74.

Huffman DR, Bohren CF. Absorption and Scattering of light by Small Particles. New York. John Wiley & Sons. 1998.

Hultén LM, et al. Harmful singlet oxygen can be helpful. *Free Rad Biol Med*. 1999;27 :1203-1207.

Ikeda T, et al. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington. 2005;252:267-272.

Ishikawa SI, et al. Photodynamic antimicrobial activity of avian eggshell pigments. *FEBS Letters*. 2010;770-774.

Ishimaru A. Electromagnetic Wave Propagation, Radiation and Scattering, Prentice Hall, New Jersey, 1991.

Ishimaru A. Wave propagation and scattering in random media. New York: Academic Press, 1978.

Jakson Z, et al. Killing of the Yeast and Hyphal Forms of *Candida albicans* Using a Light-Activated Antimicrobial. *Agent . Lasers Med Sci*. 1999;14:150–157.

Junior JF. *Curcumina e Câncer : antiproliferativo, antiapoptótico, antiangiogênico e antimetastático*. Disponível em <[www.portaleducacao.com.br](http://www.portaleducacao.com.br)>.

Kalka K, Merk H, Mukhtar H. Photodynamic therapy in dermatology. *J Am Acad Dermatol*. 2000;42:389-413.

Karu T. Low-Power Laser Therapy. *Biomedical Photonics Handbook*. Fev. 2003:48-20.

Karu, T.I. (1987): Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *IEEE*

Kérouanton A, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam. 2007: 1-7.

Klepac-Ceraj V, Patel N, Song X., Holewa C, Patel C, Kent R, Amiji MM, Soukos NS. Photodynamic effects of methylene blue-loaded polymeric nanoparticles on dental plaque bacteria. *Lasers Surg. Med*. 2011; 43:600–606.

Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetics and Molecular Research, Ribeirão Preto. 2003; 2:63-76.

Lim ME, Lee YL, Zhang Y, Chu JJH. Photodynamic inactivation of viruses using upconversion nanoparticles. Biomaterials. 2012;33:1912-1920.

Lipson RL. Em Proceedings of the 9th International Cancer Congress;Tokio, Japan, 1966.

Lisa RW, Plano MD. *Staphylococcus aureus* exfoliative toxins: How they cause disease. Journal of Investigative Dermatology, Baltimore. 2004;122:1070-1077.

Literata A, et al. Regulation of pro-inflammatory cytokine expression by Curcumin in hyaline membrane disease (HDM). Life Sci.2001;70:253-267.

Luan XL. *et al.* Histological evaluation of the safety of toluidina blue-mediated photosensitization to periodontal tissues in mice. Lasers Med Sci, 2009;24:162–166.

Malik Z, et al. The bactericidal activity of a deuteroporphyrin-hemin mixture on gram-positive bacteria. A microbiological and spectroscopic study. J. Photochem. Photobiol. B. 1990;6:419–430.

Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. Journal of Photochemistry and Photobiology B, 2005;79:159–170.

Mukerjee A, Sorensen TJ, Ranjan A P, et al . Spectroscopic Properties of Curcumin: Orientation of Transition Moments. J. Phys. Chem. B. 2010;114:12679 – 12684.

Nassu RT, et al. Diagnóstico das condições de processamento e qualidade microbiológica de produtos regionais derivados do leite produzido no Estado do Rio Grande do Norte. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 55, n. 315, p. 21-126, 2000.

Niemz MH. Laser-Tissue Interactions: Biological and medical physics, biomedical engineering. 3ª ed. Springer, 2003.

Noble WC. Skin bacteriology and the role of *Staphylococcus aureus*. British Journal of Dermatology, London. 1998;53:9-12.

Observatório Nacional, As cores do céu. 2ªed. Rio de Janeiro.2011.

Oliveira RR, *et al.* Antimicrobial Photodynamic Therapy in the No-Surgical Treatment of Aggressive Periodontitis: A Preliminary Randomized Controlled Clinical Study. Journal of Periodontology. 2007;78:965-973.

Pagonis TC, Chen J, Fontana CR, Devalapally H, Ruggiero K, Song X, Foschi F, Dunham J, Skobe Z, Yamazaki H, Kent R, Tanner ACR, Amiji MM, Soukos NS. Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. J. Endod. 2010;36:322–328.

Paiva MSD, Cardonha AMS. Queijo de coalho artesanal e industrializado produzidos no Rio Grande do Norte: estudo comparativo da qualidade microbiológica. Higiene Alimentar, São Paulo. 1999;13:33.

- Pass HI. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J.Nat. Cancer Inst.* 1993;85:443-456.
- Patterson, M S, Chance, B, and Wilson, B C. Time resolved reectance of transmittance for the non-invasive measurement of tissue optical properties. *Appl Opt.* 1989;28:2331-2336.
- Pereira ML, et al. Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning. *Journal of Food Protection, Des Moines.*1996;59:559-561.
- Peresi JTM, et al. Queijo minas tipo frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. *Higiene Alimentar, São Paulo.* 2001;15:63-70.
- Perussi JR. Inativação Fotodinâmica de Microrganismos. *Quim. Nova.* 2007;30:988-994.
- Policard, A. Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Wood. *CR Soc. Biol.* 1924;91:1423 - 1428.
- Prasad PN. Introduction to Biophotonics. New Jersey. Wiley Interscience, 2003.
- Prates RA, et al. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B.* 2007;86:70–76.
- Raab O. Ueber die Wirkung fluorizierender Stoffe auf Infusorien. *Z. Biol.*1900;39:524-546.
- Ragas X, et al. Photodynamic inactivation of *Acinetobacter baumannii* using phenothiazinium dyes: In vitro and in vivo studies. *Lasers in Surg and Med.* 2010;42:384-390.
- Ramsewak RS, et al. Cytotoxicity, antioxidan and anti-inflammatory activities of curcumins I-III from *Curcuma longa*. *Phytomedicine.* 2000;7:303-8.
- Ravel R. Laboratório Clínico: Aplicações Clínicas dos Dados Laboratoriais. 6ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997:162-163.
- Ribeiro MS, et al. Terapia fotodinâmica antimicrobiana. Aplicações na odontologia. Cap. 07; Livro Virtual; 25º CIOSP; São Paulo; 2005.
- Rovaldi CR, Pievsky A, Sole NA, Friden PM, Rothstein DM, Spacciali P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against Oral Pathogens *In Vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2000;44:3364-3367.
- Roy SC, Pratt RH, Kissel L. Rayleigh scattering by energetic photons:Development of theory and current status. *Radiation physic chemistry.* 1993;41:725-738.
- Ruby AJ, et al. Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Letters.* 1995;9:79-83.
- Rusig O, Martins MC. Efeito da temperatura, do pH e da luz sobre extratos de oleorresina de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) e Curcumina. *Revista Brasileira de Corantes Naturais.* 1992;1:158-164.

Santos AL, et al. *Staphylococcus aureus*: Visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Bras. Pastol. Med. Lab.* 2007;43:413-423.

Santos AL, et al. *Staphylococcus aureus*: Visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Bras. Pastol. Med. Lab.* 2007;43:413-423.

Sigusch BW. *et al.* Full-Mouth Antimicrobial Photodynamic Therapy in *Fusobacterium nucleatum*–Infected Periodontitis Patients. *Journal of Periodontology.* 2010;81:975-981.

Simone FGV, et al. Photodynamic inactivation of *S.aureus* and *Escheria coli* biofilms by malachite green and phenothiazine dyes: An in vitro study. *Archives of oral Biology.* 2012.

Simplicio FI, Maionchi F, Hioka N. Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, Aplicações e Avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quim. Nova.* 2002;25:801-807.

Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *Journal of Medical Microbiology, Edinburgh.* 2001;50:940-946.

Soukos NS, et al. Photodestruction of Human Dental Plaque Bacteria: Enhancement of the Photodynamic Effect by Photomechanical Waves in an Oral Biofilm Model. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2003;33:161-168.

Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol* 2000. 2011; 55:143–166.

Sousa GR. Análise comparativa da emissão de luz por led e lasers emitindo no vermelho do espectro eletromagnético na redução de bactérias periodontopatogênicas. Estudo “in vitro” [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.

Sternberg ED, Dolphin D, Brückner C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron.* 1998;54: 4151- 4202.

Takahashi MY. Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2ª ed. São Paulo: 1987.

Tappeiner VH. *Muench. Med. Wochenschr.* 1903;47:2024.

Toyokawa H, et al. Promotive effects of far-infrared ray on full-thickness skin wound healing in rats. *Exper Biol and Med.* 2003;228:724-729.

Trelles MA, et al. The action of low reactive level LASER therapy (LLLT) on mast cells: a possible pain relief mechanism examined. *LASER Therapy.* 1989;1:27-30.

Von Tappeiner H, Jesionek A. Ueber die Wirkung der photodynamischen fluoreszierenden Stoffe auf Infusorien. *Dtsch. Arch. Klin.Med.* 1904;80:427-487.

Wainwright M, et al. Photoinactivation of viruses. *Photochemical and Photobiology Sciences.* 2004;3:406- 411.

Wainwright M. Pathogen Inactivation in Blood Products. *Current Medicinal Chemistry*. 2002;9:127-143.

Wainwright M. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1998;42: 13-28.

Wilson M, et al. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Current Microbiology*. 1992;25:77-81.

Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochemical and Photobiology Sciences*. 2004;3:412-418.

Zecconi A, Hahn G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. *Bulletin of the International Dairy Federation, Bruxelles*. 2000; 345:15-18.

Zilio SC. *Óptica Moderna: Fundamentos e aplicação*. São Carlos: Compacta, 2009. 300 p.