

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS

ESCOLA NORMAL SUPERIOR

LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DANIELLA FREITAS DE LIMA

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM
FOTOSENSIBILIZANTE NATURAL NA INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS DE
IMPORTÂNCIA MÉDICA**

Manaus, 2023

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS

ESCOLA NORMAL SUPERIOR

LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DANIELLA FREITAS DE LIMA

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM
FOTOSENSIBILIZANTE NATURAL NA INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS DE
IMPORTÂNCIA MÉDICA**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura de Ciências Biológicas, da Universidade do Estado do Amazonas da Escola Normal Superior para obtenção do Grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profª Dra. Larissa Kirsch Barbosa

Co-Orientador: Prof. Dr. Raimundo Sousa Lima Junior

Manaus, 2023

Ficha Catalográfica

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

Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

L732aa LIMA, DANIELLA FREITAS DE
Avaliação da terapia fotodinâmica com
fotossensibilizante natural na inibição de
bactérias de importância médica / DANIELLA
FREITAS DE LIMA. Manaus : [s.n], 2023.
33 f.: color.; 30 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas -
Licenciatura

- Universidade do Estado do Amazonas,
Manaus, 2023. Inclui bibliografia

Orientador: Larissa Kirsch

Barbosa Coorientador: Raimundo
Sousa Lima Junior

· Patógenos. 2. Antimicrobiano. 3.
Microrganismo.

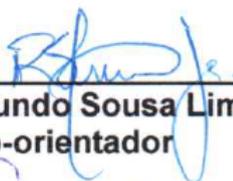
I. Larissa Kirsch Barbosa (Orient.). II.
Raimundo Sousa Lima Junior (Coorient.).
III. Universidade do Estado do Amazonas.
IV. Avaliação da terapia fotodinâmica com
fotossensibilizante natural na inibição de
bactérias de importância médica

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM
FOTOSENSIBILIZANTE NATURAL NA INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS DE
IMPORTÂNCIA MÉDICA**

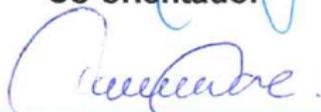
DANIELLA FREITAS DE LIMA

Aprovada em 01/03/2023

BANCA EXAMINADORA



Profº. Dr. Raimundo Sousa Lima Júnior
Co-orientador



Profª. M.Sc. Cleudiane Pereira de Andrade
1º Avaliador(a)



Profª. Dra. Francisca da Silva Ferreira
2º Avaliador(a)

RESUMO

Este estudo visa descrever testes de Terapia Fotodinâmica (TFD) que foram realizados com diferentes espécies de bactérias de importância médica, as quais são responsáveis por muitas infecções hospitalares. Nesta técnica é empregado o uso de um fotossensibilizante (FS) para interagir com as células de interesse e causar uma reação fotodinâmica, que utiliza o oxigênio disponível no meio para levar a célula à apoptose. A TFD atualmente é estudada como tratamento antimicrobiano, para auxiliar em cicatrizações de feridas e também para tratar tumores. Os objetivos do trabalho foram avaliar a eficácia da TFD na inibição de microrganismos de importância médica, verificando se o tempo de submissão ao tratamento fotodinâmico em diferentes comprimentos de onda, de 254 nm e 365 nm, afetam o crescimento das bactérias, e se demonstra efeito inibitório e bactericida, utilizando como FS extrato natural de *Acmella oleracea* (jambu) e *Bixa orellana* (Urucum). Para o experimento, foram preparadas soluções com os microrganismos a partir da escala 0,5 de McFarland (1:1; 1:10; 1:100 e 1:1000) e os fotossensibilizantes diluídos em diferentes concentrações (0,1; 0,055 e 0,01 mg/mL), foram preparadas uma Placa Controle (PC) para cada espécie e as microplacas para submissão em luz ultravioleta (UV) a 254 nm e 365 nm em cabine escura, com distância de 15 cm entre a amostra e a fonte de luz, por intervalos de tempo predeterminados em 30 minutos e 60 minutos. As microplacas foram analisadas na leitora de placas a 630 nm antes da submissão à luz UV e novamente após 24 horas para a contagem das células e análise dos dados. Também foi utilizada Resazurina como revelador de atividade microbiana. Os resultados mostraram efeito inibitório no crescimento das bactérias, que não foi observado em todas as amostras estudadas quando comparadas à PC. Além disso, a luz também causou efeito inibitório nas amostras sem aplicação de FS. O efeito bactericida não foi observado. A espécie em que ocorreram resultados mais satisfatórios foi a *P. mirabilis* que demonstrou ser mais sensível às condições fornecidas.

Palavras-chave: Patógenos; Antimicrobiano; Microrganismo.

ABSTRACT

This study aims to describe Photodynamic Therapy (PDT) tests that were performed with different species of medically important bacteria, which are responsible for many nosocomial infections. In this technique, the use of a photosensitizer (PS) is employed to interact with the cells of interest and cause a photodynamic reaction, which uses the oxygen available in the environment to lead the cell to apoptosis. PDT is currently studied as an antimicrobial treatment, to aid in wound healing and also to treat tumors. The objectives of the study were to evaluate the effectiveness of PDT in inhibiting microorganisms of medical importance, verifying whether the time of submission to photodynamic treatment at different wavelengths, 254 nm and 365 nm, affects the growth of bacteria, and whether it demonstrates an effect inhibitory and bactericidal, using natural extract of *Acmella oleracea* (jambu) and *Bixa orellana* (urucum) as PS. For the experiment, solutions were prepared with the microorganisms from the 0.5 scale of McFarland (1:1; 1:10; 1:100 and 1:1000) and the photosensitizers diluted in different concentrations (0.1; 0.055 and 0.01 mg/mL), a Control Plate (PC) was prepared for each species and the microplates were submitted to ultraviolet light (UV) at 254 nm and 365 nm in a dark cabin, with a distance of 15 cm between the sample and the light source, for predetermined time intervals of 30 minutes and 60 minutes. Microplates were analyzed on the plate reader at 630 nm before submission to UV light and again after 24 hours for cell counting and data analysis. Resazurin was also used as a developer of microbial activity. The results showed an inhibitory effect on the growth of bacteria, which was not observed in all samples studied when compared to CP. In addition, light also caused an inhibitory effect in samples without PS application. The bactericidal effect was not observed. The species in which the most satisfactory results occurred was *P. mirabilis*, which proved to be more sensitive to the given conditions.

Keywords: Pathogens; antimicrobial; Microorganism.

Sumário

1.	OBJETIVOS	5
2.	REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1	Terapia Fotodinâmica	5
2.2	Fotossensibilizante	7
2.3	Fonte de luz	8
2.4	Efeito da TFD em bactérias	9
3.	METODOLOGIA	10
3.1	Origem dos microrganismos	10
3.3	Reativação e cultivo dos microrganismos	11
3.4	Coloração de Gram	11
3.5	Fotossensibilizante	12
3.6	Avaliação da TFD	13
3.7	Análise de dados	15
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1	Reativação e cultivo dos microrganismos	15
4.2	Coloração de Gram	16
4.4	Avaliação da TFD	17
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
	REFERÊNCIAS	26

INTRODUÇÃO

Os microrganismos sofrem mutação constantemente, esse fato leva a pensar que os fármacos e formas para combater os patógenos deveriam acompanhar essa constante evolução. Porém os estudos não acompanham o mesmo ritmo de desenvolvimento dos microrganismos, além disso, a população ao tomar antibióticos de forma desordenada e sem seguir corretamente as orientações da bula acabam fornecendo às bactérias, por exemplo, condições para sofrerem mutações e dessa forma, se tornarem resistentes aos fármacos (GOOL e FARIA, 2013). Considerando estes fatores, estudos sobre alternativas com baixo custo, que possam impedir modificações/resistência pelos microrganismos devem ser consideradas.

A TFD está sendo utilizada ao longo dos anos como alternativa para antimicrobianos e consiste no fornecimento de energia luminosa, em diferentes comprimentos de onda que visam causar na célula um efeito citotóxico e conseqüentemente apoptose. No contexto dos estudos serem realizados para tratamento em seres vivos, a TFD, junto a um fotossensibilizante causa seletividade na exposição da célula, ou seja, ele é aplicado no local infectado com microrganismos, se adere a essas células e quando aplicada a fonte luminosa há apoptose sem prejudicar as células do hospedeiro infectado (RONQUI, 2015), sendo considerada uma técnica segura de desinfecção, devido à aplicação dos fotossensibilizantes. O método envolve um custo-benefício bom por serem utilizados componentes atóxicos. Dessa forma, é importante desenvolver estudos sobre a avaliação da eficiência da TFD em microrganismos de importância médica. Pois, segundo Brandão (2020) esta utilização permite que haja um efeito satisfatório em infecções localizadas. Portanto, essa pesquisa foi realizada com o intuito de contribuir com informações sobre a terapia fotodinâmica e seus efeitos como antimicrobiano em diferentes períodos de tempo.

Autores como Vilela (2010), Ronqui (2015), Brandão et al. (2020), trazem importantes pesquisas sobre a terapia fotodinâmica (TFD) com a realização de testes principalmente com *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, microrganismos responsáveis por muitas infecções hospitalares. Os autores apresentam como fotossensibilizante, em maioria, o corante azul de metileno.

O problema identificado para a pesquisa foi a seguinte pergunta “como utilizar a terapia fotodinâmica como alternativa a antibióticos?”. A partir desta pergunta formula-se a

hipótese de que a terapia fotodinâmica é eficiente para o tratamento de infecções microbianas, podendo ser usado como alternativa a antibióticos por se tratar de condições físicas de submissão, como a luz (RONQUI, 2015; SANTANA, 2020).

1. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica na inibição de microrganismos de importância médica.

Objetivos específicos

- Avaliar se o tempo de submissão ao tratamento fotodinâmico no crescimento das bactérias patogênicas demonstra efeito inibitório e bactericida;
- Verificar se os comprimentos de onda 254nm e 365 nm demonstraram efeito inibitório e bactericida;
- Verificar se os extratos de *B. orellana* e *A. oleracea* são eficazes como fotossensibilizante na Terapia Fotodinâmica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

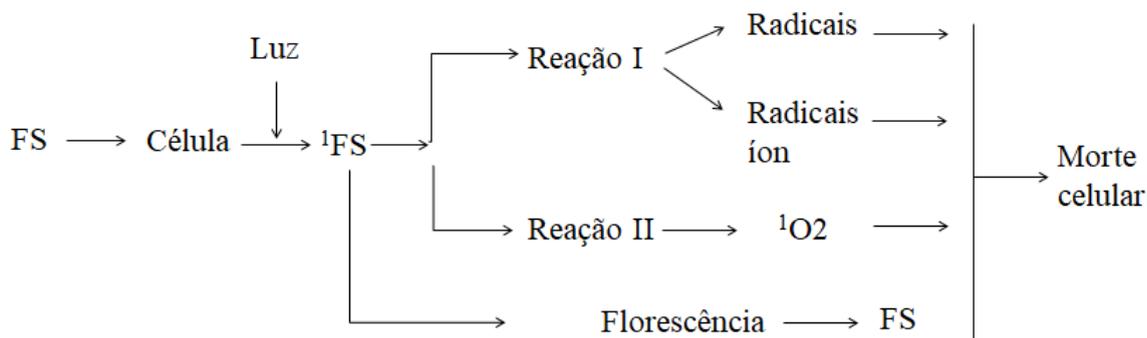
2.1 Terapia Fotodinâmica

A TFD começou a ser utilizada por egípcios, chineses, indianos e gregos para fins terapêuticos no tratamento de psoríase e vitiligo. Em 1903, foi empregada no tratamento de *Lupus vulgaris* pelo investigador Finsen. Em seguida, Oscar Raab percebeu que a aplicação de uma substância com característica fotossensibilizante (acridina) em um paramécio seguido da aplicação da luz, era tóxica ao protozoário. Esta substância, ao absorver a luz, causava uma reação fotoquímica ou fotofísica (TEIXO, 2013).

O termo “reação fotodinâmica” foi definido por Von Tappeiner como reações ocorrentes na presença de oxigênio molecular (O_2), pois concluiu que a fotossensibilização é um processo dinâmico: a aplicação de um fotossensibilizante é seguida pela emissão de uma fonte de luz sobre as células. O comprimento de onda de luz utilizado na TFD deve ser adequado ao fotossensibilizante, pois a luz irá excitar as moléculas e, dependendo do estado em que estas moléculas se encontrarão, poderá ocorrer a emissão de fluorescência, mas sem o efeito fotodinâmico (quando pouco excitadas), ou quando o comprimento de luz é adequado

as moléculas podem originar dois tipos de reações foto-oxidativas. Na reação I (Figura 1) ocorre a transferência de elétrons ou prótons H^+ , que resulta em produções de radicais livres, pois os intermediários liberados irão formar peróxido, íons superóxido e radicais hidroxilo, os quais são tóxicos para as células. Na reação II, a energia é transferida para o oxigênio, que passa para o estado singlete, ou seja, muito reativo, e o fotossensibilizante retorna ao seu estado basal (BENVINDO et al, 2007; TEIXO, 2013; RONQUI, 2015).

Figura 1: Princípio da Terapia Fotodinâmica



Legenda: FS – Fotossensibilizante em estado normal; 1FS – estado excitado;

Fonte: TEIXO, 2013

A meia vida do oxigênio singlete é curta e a TFD viabiliza a morte das células de três formas: apoptose (mais comum), necrose e autofagia. A apoptose, em células eucariontes, ocorre principalmente quando o fotossensibilizante afeta a mitocôndria, pois esta organela faz parte da regulação do processo de morte celular quando ocorre inibição de energia (adenosina trifosfato – ATP). No processo de necrose, é ativada a proteína R1P1, produção exacerbada de oxigênio reativo, dano de lisossoma e excesso de cálcio intracelular. A autofagia é para degradação ou reciclagem de proteínas e organelas intracelulares, a qual é ativada por sinais de estresse (TEIXO, 2013).

Tappeiner, o mesmo pesquisador que definiu o termo Terapia Fotodinâmica, por volta dos anos 1900 ainda investigou o potencial antitumoral desta técnica resistentes (BENVINDO et al, 2007; TEIXO, 2013). Atualmente, além destas utilidades, a TFD é empregada para fins odontológicos e antimicrobianos, utilizada junto ao tratamento convencional para controle de infecções (GONÇALVES, 2018; EDUARDO et al, 2015).

Estudos realizados em camundongos mostraram que a técnica pode ser utilizada no tratamento de feridas localizadas infectadas por bactérias resistentes a antibióticos, pois se o

fotossensibilizante (FS) for aplicado topicamente, a TFD irá atuar em conjunto com o sistema imunológico, melhorando o processo de cicatrização (DEMIDOVA e HAMBLIN, 2004). A partir desta pesquisa, abriu-se uma possibilidade de estudos sobre TFD para o tratamento de ferimentos, Brandão et al (2020) publicou um estudo sobre a terapia como tratamento a infecções, com aplicação de FS seguido de luz em feridas de pessoas com diabetes mellitus, a qual demonstrou significativa cicatrização e possibilitou a melhora do membro, evitando a amputação. Outra utilização antimicrobiana da TFD é para superfícies, mediante a utilização de díodos emissores de luz UV para prevenir infecções em tubos de teflon e silicone destinados a produção de cateter (BAK et al, 2010).

Corroborando com esses trabalhos, Guanabara et al. (2017) estudou o efeito da Terapia Fotodinâmica na cicatrização de tecidos, reconhecendo o azul de metileno ou azul de toluidina como fotossensibilizantes, eles perceberam que somente com a aplicação desses corantes, já obtém-se um efeito bactericida, com ação terapêutica, e que a emissão de luz apenas intensificara o efeito terapêutico da TFD.

2.2 Fotossensibilizante

Na TFD, aplicação do fotossensibilizante (FS) é definida de acordo com a finalidade desejada para a técnica, como por exemplo, para tratar tumores. São utilizadas drogas com afinidade com a célula alvo que irão se aderir a ela proporcionando seletividade, de forma que ao ser exposto à luz apenas o local com o FS sofrerá efeito, sem afetar tecidos saudáveis. As aplicações podem ser diretamente no local da infecção ou na corrente sanguínea, para aderir-se às células alvo.. Da mesma forma que se for utilizado como antimicrobiano, será aplicado um FS compatível a esta célula (DEMIDOVA e HAMBLIN, 2004; TEIXO, 2013). Para uso na microbiologia, estudos como de Vilela (2010) e Brandão (2020) apresentam azul de metileno e azul de toluidina como FS. Benvindo et al. (2007) e Ronqui (2015) utilizaram somente azul de metileno como FS em seus estudos, que apresentaram todos dados satisfatórios da TFD antimicrobiana.

O FS ideal deverá ser um composto quimicamente puro, ser de rápida remoção do tecido, quando aplicado em seres vivos, não ser tóxico na ausência de fonte luminosa, ter seletividade com a célula que se quer ter o efeito fotodinâmico, além de permitir a formação de oxigênio singleto (TEIXO, 2013).

O azul de metileno, muito utilizado em estudos deve-se por ele fazer parte do grupo composto denominado fenotiazina, que apresentam tendência a formar espécies reativas de oxigênio, que para o efeito da TFD, se encaixa como um FS ideal. Porém Siqueira et al. (2018) testou o potencial fotossensibilizante das plantas *Myracrodruon urundeuva*, *Stryphnodendron adstringens* e *Sideroxylon obtusifolium* na Terapia Fotodinâmica antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. Dentre estes, duas espécies (*Myracrodruon urundeuva* e *Stryphnodendron adstringens*) apresentaram eficiência como um fotossensibilizante natural.

Os fotossensibilizantes naturais estão sendo avaliados como substitutos a corantes sintéticos devido serem de baixa toxicidade, baixo custo e de fácil obtenção (COUTINHO, et al. 2016; VERÍSSIMO, 2003). O extrato de *Bixa orellana* tem sido utilizado em diversas pesquisas na área da odontologia, afim de averiguar efeito bactericida em tratamentos de halitose (MAIA, et al, 2021). Na extração e utilização dele, podem ser utilizados diferentes solventes lipossolúveis, os quais expressarão ao corante, comprimentos de onda diferentes para absorção de luz (SILVA et al, 2017; ANSELMO et al. 2008).

2.3 Fonte de luz

Para que a TFD tenha eficácia, é importante a relação entre a emissão de fonte luminosa em um comprimento de onda adequado (o comprimento de onda é relevante neste ponto, pois nem todos serão capazes de emitir efeito fotodinâmico) e a penetração na célula. O espectro de ação dos FS também é relevante para a absorção da luz pela célula, pois dependendo de qual FS for utilizado, implica no comprimento de onda da fonte luminosa que terá efeito. E este fator interfere neste processo devido ser eficaz até 850 nm de comprimento, a fonte luminosa irá transferir energia ao oxigênio e deixá-lo em estado singleto (Figura 1). As fontes luminosas são: lâmpadas de largo espectro, díodos e lasers. São relevantes I) a influência total de luz a ser aplicada, isto é, a energia que será aplicada no tecido biológico, II) a taxa de fluência (medida por J/m^2), III) o tempo de exposição e IV) o modo de emissão da fonte luminosa. (TEIXO, 2013).

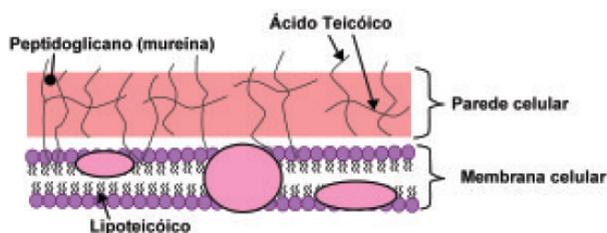
Do ponto de vista da eficácia terapêutica, das fontes luminosas disponíveis, o mais indicado e que atende melhor às expectativas são os lasers, por serem capazes de emitir diferentes comprimentos de onda e a aplicação precisa da luz. A tecnologia de fibra ótica permite a penetração mais profunda no microrganismo, que apenas a fonte de luz superficial não seria capaz. As outras fontes luminosas possuem pontos negativos que limitam seu uso, as

lâmpadas de largo espectro não entregam luz em partes mais internas e os díodos emitem apenas um comprimento, que implica na versatilidade do seu uso, o que é negativo, pois ao emitir apenas um comprimento de onda, o seu uso torna-se limitado (TEIXO, 2013).

2.4 Efeito da TFD em bactérias

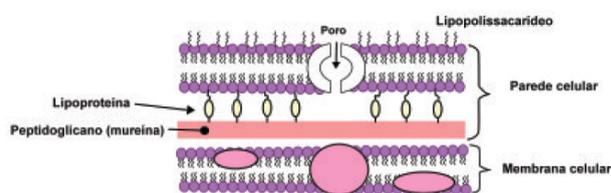
Com o efeito da Terapia Fotodinâmica, as células bacterianas sofrem morte celular devido ao fotossensibilizante, o qual dependendo da concentração ocorrerá excitação eletrônica do mesmo, dessa forma ocorrerá os mecanismos descritos na Figura 1. Ocorrerá a transferência de elétron entre o fotossensibilizante, energia luminosa e os componentes da célula, formando íons radicais livres, que irão reagir com o oxigênio do ambiente, o que resulta na formação de espécies reativas de oxigênio, com efeito citotóxico e assim a morte celular. Essas interações podem também causar na célula alteração na permeabilidade e integridade da membrana plasmática, alterando a permeabilidade da membrana e o gradiente de concentração, e a depender do comprimento de onda empregado, ela é absorvida e leva a inativação de enzimas. Isso será prejudicial às células assim como o efeito citotóxico gerado (AMARAL, et al., 2010).

Figura 2: Parede celular de Gram (+)



Fonte: MOLINARO, 2009

Figura 3: Parede celular de Gram (-)



As bactérias Gram (+) (Figura 2) são mais susceptíveis a apoptose do que bactérias Gram (-) devido as Gram (+) possuem facilidade em absorver corante, pois são mais porosas. Já as Gram (-) (Figura 3) apresentam uma resistência significativa devido às estruturas da parede celular, a Gram (-) possui uma espessa camada de peptídeooglicano, a qual contém glicocálix, lipopolissacarídeo, bicamada lipídica e periplasma acima da bicamada fosfolipídica, que tornam esta estrutura externa complexa (VILELA, 2010). A estrutura de membrana das Gram (-) atuam como uma barreira e impedem que o fotossensibilizante (FS) penetre na bactéria. Alguns métodos podem ser adotados para permitir a entrada do FS, como a utilização de soluções a base de polimixina B, ácido etilenodiamino tetracético ou ainda FS com carga catiônica. Estes FS de carga positiva são capazes de aderirem à superfície de

bactérias Gram (+) e Gram (-). Em bactérias que naturalmente secretam pigmentos à base de porfirinas não é necessário o uso de FS exógenos, devido a produção e acúmulo nas células, pois esses pigmentos atuam como um fotossensibilizante natural (DEMIDOVA e HAMBLIN, 2004; PERUSSI, 2007).

Alguns exemplos de aplicação TFD podem ser citados, como a pesquisa de Benvindo et al. (2007) que realizou experimentos utilizando o Azul de Metileno como fotossensibilizante em bactérias patogênicas ao homem, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, com comprimento de onda de 670 nm, infravermelho e laser de baixa potência, entretanto, obteve resultados negativos, pois a potência do laser não foi capaz de causar efeitos bactericidas. Porém, Pinto (2013) testou a TFD com *S. aureus* resistentes a antibióticos e também utilizou comprimento de onda na faixa de luz vermelha, em 660 nm, e aplicou curcumina como FS natural, oriunda do açafrão-da-índia e seus resultados demonstraram redução significativa na atividade metabólica das bactérias utilizadas, mesmo com laser de baixa potência.

Estes estudos demonstraram que frequentemente tem-se pesquisado formas alternativas, seguras, não tóxicas e de baixo custo para tratar infecções provenientes de bactérias patogênicas. Galo (2018) utilizou luz azul para diferentes protocolos já descritos sobre terapia fotodinâmica sem a utilização de fotossensibilizante. Em seus ensaios concluiu que no comprimento de luz submetido, é necessário elevado tempo de submissão para adquirir-se efeito inibitório. Após submissões em sequência de bactérias patogênicas à TFD, o autor notou o início de respostas em *E. coli* que demonstram futura resistência à terapia.

Desse modo, é possível perceber que a TFD é uma técnica promissora como antimicrobiano em substituição à antibióticos ao analisar o mecanismo de ação e seus efeitos mencionados nos estudos acima.

3. METODOLOGIA

3.1 Origem dos microrganismos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Química Aplicada a Tecnologia, da Escola Superior de Tecnologia (EST – UEA). As cepas de microrganismos utilizadas foram adquiridas da Cefar Diagnóstica LTDA, as quais são bioquimicamente semelhantes a uma

cepa ATCC. Elas são de importância médica e responsáveis por causar infecções hospitalares: *Staphylococcus aureus* CCCD-S009, *Staphylococcus epidermidis* CCCD-S010, *Escherichia coli* CCCD-E005, *Pseudomonas aeruginosa* CCCD-P004, *Proteus mirabilis* CCCD-P001 e *Streptococcus pneumoniae* CCCD-S011.

3.2 Preparo dos Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados nesta pesquisa foram o Ágar Mueller Hinton (AMH) e Caldo Mueller Hinton (CMH). O meio de cultura AMH foi preparado em Erlenmeyer, autoclavado a 121°C por 15 minutos e deixado resfriar. Em seguida, foi vertido em placas de Petri de 90x15mm e após a solidificação do ágar, as placas foram devidamente embaladas em filme de PVC e armazenadas em geladeira. O meio CMH, foi preparado dissolvendo 21g/L para 1000 mL de água destilada, autoclavado à 121 °C por 15 minutos, resfriado e armazenado em geladeira até a utilização (RONQUI, 2015).

3.3 Reativação e cultivo dos microrganismos

O manuseio das bactérias para o experimento foi realizado em cabine de segurança biológica. Cada espécie de bactéria foi semeada em AMH em placa de Petri de 90x15mm com o auxílio de alça bacteriológica e incubadas a 37 °C por 24 horas.

Após a incubação, foi retirado com o auxílio de alça bacteriológica estéril, uma quantidade de colônia bacteriana e inoculada em Erlenmeyer contendo 30mL de CMH, vedado com gaze e algodão. Este inóculo foi incubado em B.O.D a 37 °C por 24 horas.

3.4 Coloração de Gram

Antes das análises serem iniciadas, foi realizada a coloração de Gram com as bactérias em estudo para averiguar pureza. O procedimento ocorreu após a ativação das bactérias (item 4.3). Em uma lâmina limpa, foi adicionado uma gota de água destilada estéril, e com o auxílio de uma alça bacteriológica, após ser flambada e deixada esfriar, foi retirado do meio de CMH uma amostra de bactéria e movimentos de rotação foram feitos na lâmina para obter-se um esfregaço oval, uniforme e fino. Em seguida, o material foi passado na chama do bico de Bunsen na face oposta ao esfregaço para a fixação. Feito isso, a lâmina estava pronta para ser corada e iniciou-se o protocolo de coloração de Gram. Primeiramente, a lâmina foi coberta com solução cristal violeta e após um minuto contado, foi retirado com um filete de água corrente. Em seguida foi acrescentado à superfície da lâmina a solução de lugol e novamente contado 1 minuto para a retirada do corante. Após isso, foi gotejado álcool-acetona, que agiu

por 30 segundos antes de ser removido com água novamente. Por fim, a lâmina foi coberta com fucsina e também foi contado 30 segundos para sua retirada com água (SERRA et al. 2001).

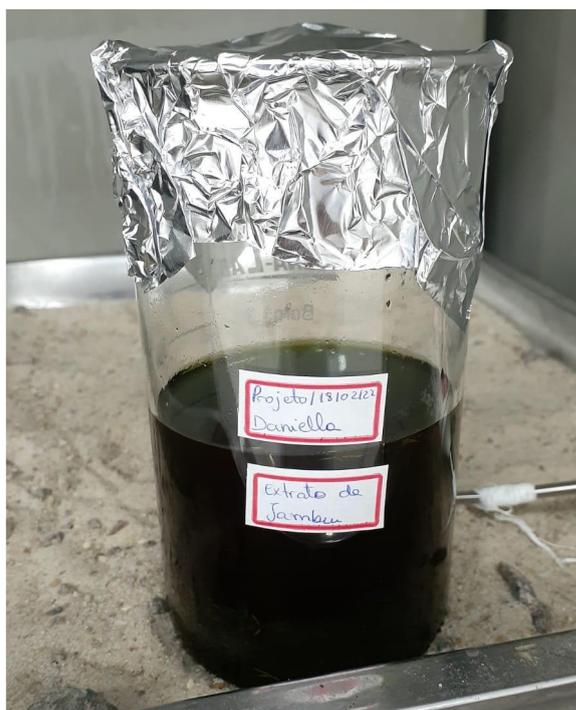
Para cada bactéria foi preparada uma lâmina, e após esse procedimento sob cada uma delas, foi aguardado a secagem total do material. Feito isso, foi adicionado uma gota de óleo de imersão e observado em microscópio na objetiva de 100x. As bactérias puras foram utilizadas nos experimentos seguintes.

3.5 Fotossensibilizante

Foram utilizados como fotossensibilizantes o extrato etanólico de *Acmella oleracea* (jambu) e *Bixa orellana* (urucum) (NASCIMENTO, 2019). Para obtenção do extrato etanólico de *A. oleracea*, foram separadas as folhas e postas para secagem em estufa a 40 °C por 48 horas, seguidas de maceração com etanol P.A (SIQUEIRA et al., 2018).

As sementes de *B. orellana* foram secas em estufa de secagem por 24 horas a 40 °C, trituradas e adicionado o solvente etanol P.A durante 24 horas (ANSELMO, 2008). Os extratos etanólicos obtidos após 48 horas (*A. oleracea*) e 24 horas (*B. orellana*) foram filtrados e submetidos a concentração em banho de areia (Figura 4) e redissolvidos em Tween 80 dissolvidos a 20% em água destilada. Com isso, foram preparadas as concentrações de 0,1 mg/mL, 0,055 mg/mL e 0,01 mg/mL dos extratos de *A. oleracea* e *B. orellana*, para os experimentos seguintes.

Figura 4: Extrato de *A. oleracea* em banho de areia



Fonte: A autora, 2023

3.6 Avaliação da TFD

Após o teste de coloração de Gram, os experimentos foram iniciados. Foram preparados depois de completado o tempo de incubação dos microrganismos (Item 4.3). Aliquotas de 1000 μ L do meio com bactérias foi diluído em caldo MH até atingir o padrão de turvação de 0,5 na escala McFarland, a fim de obter-se $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL. Em sequência, a partir da concentração de 0,5 de McFarland, foram realizadas diluições nas concentrações 1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000.

Para avaliar o efeito da TFD no crescimento microbiano, foram preparadas microplacas de 96 poços, com 150 μ L de caldo MH e microrganismos testes nas concentrações mencionadas acima (ASSIS, 2007). Em cada amostra diluída também foram acrescentadas 150 μ L das concentrações preparadas de FS, dispostas conforme Figura 5 (SIQUEIRA et al, 2018). Os grupos controle foram poços, em triplicata, sem FS nas microplacas, correspondente a cada concentração de microrganismos, que foram submetidos a irradiação junto às amostras. Também foi preparada outra microplaca para o controle nas mesmas condições descritas (com o FS), as quais não foram expostas a radiação e após o preparo das placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

Na Figura 5 observa-se as concentrações de bactérias identificadas na primeira coluna, junto a letra correspondente de cada linha. Cada quadrado representa os 96 poços da microplaca, identificado com as concentrações de FS e diferenciadas por cores.

Figura 5: Disposição de concentrações de bactérias e FS em microplaca

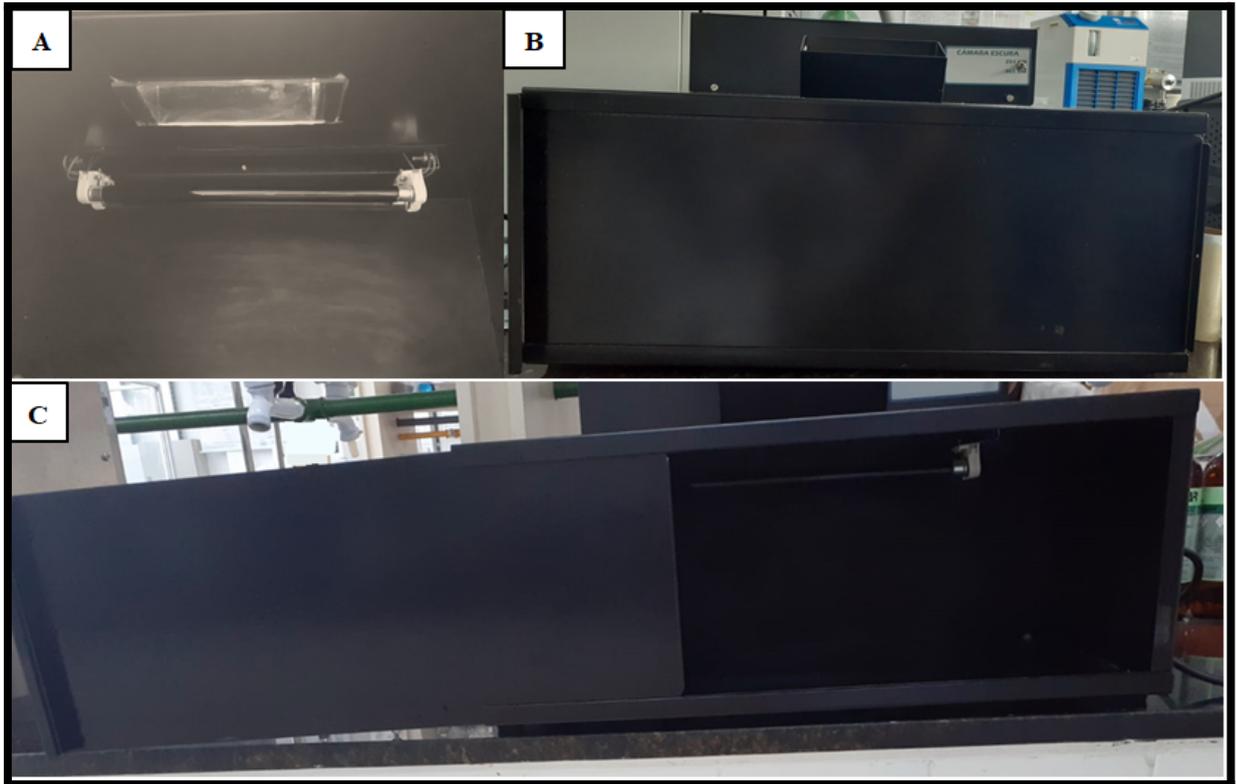
DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES NAS MICROPLACAS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A 1:1	0,01 mg/mL	0,01 mg/mL	0,01 mg/mL	0,055 mg/ml	0,055 mg/ml	0,055 mg/ml	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	CONTROL E 1:1	CONTROLE 1:1	CONTROLE 1:1
B 1:10	0,01 mg/mL	0,01 mg/mL	0,01 mg/mL	0,055 mg/ml	0,055 mg/ml	0,055 mg/ml	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	CONTROL E 1:10	CONTROLE 1:10	CONTROLE 1:10
C 1:100	0,01 mg/mL	0,01 mg/mL	0,01 mg/mL	0,055 mg/ml	0,055 mg/ml	0,055 mg/ml	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	CONTROL E 1:100	CONTROLE 1:100	CONTROLE 1:100
D 1:1000	0,01 mg/mL	0,01 mg/mL	0,01 mg/mL	0,055 mg/ml	0,055 mg/ml	0,055 mg/ml	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	CONTROL E 1:1000	CONTROLE 1:1000	CONTROLE 1:1000
E 1:1	0,01 mg/ml	0,01 mg/ml	0,01 mg/ml	0,055 ml/ml	0,055 ml/ml	0,055 ml/ml	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	VAZIO	VAZIO	VAZIO
F 1:10	0,01 mg/ml	0,01 mg/ml	0,01 mg/ml	0,055 ml/ml	0,055 ml/ml	0,055 ml/ml	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	VAZIO	VAZIO	VAZIO
G 1:100	0,01 mg/ml	0,01 mg/ml	0,01 mg/ml	0,055 ml/ml	0,055 ml/ml	0,055 ml/ml	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	VAZIO	VAZIO	VAZIO
H 1:1000	0,01 mg/ml	0,01 mg/ml	0,01 mg/ml	0,055 ml/ml	0,055 ml/ml	0,055 ml/ml	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	VAZIO	VAZIO	VAZIO

Fonte: A autora, 2023

Legenda: as cores em tons de laranja (nas linhas A, B, C, D e E) representam os extratos de *B. orellana*; e as cores em tons verdes (nas linhas E, F, G e H) representam os extratos de *A. oleracea*. As diferenças nas cores representam as concentrações das diluições.

Após este preparo, a microplaca foi posta em uma câmara escura (Figura 6) e exposta a diferentes nanômetros de comprimento de onda de energia luminosa Ultravioleta (UV). Neste estudo, os comprimentos de onda testados foram de 254 nm (UVC) e 365nm (UVA), nos intervalos de tempo de 30 minutos e 60 minutos, a fim de identificar se o comprimento de onda em um tempo mínimo seria eficaz para ter a concentração mínima inibitória (CMI), e um tempo máximo de exposição para um efeito de concentração mínima bactericida (CMB). Para isso, foram preparadas microplacas com diferentes bactérias, nas mesmas condições, para a submissão em diferentes comprimentos de onda em cabine escura, com distância de 15 cm da placa e da lâmpada tubular da cabine escura. Passado o tempo de cada ensaio, as microplacas foram incubadas em B.O.D. a 37 °C por 24h. Após a incubação, foi verificado se ocorreu crescimento microbiológico.

Figura 6: Câmara escura



Fonte: A autora, 2023

Legenda: A: lâmpadas tubulares de 254 nm e 365 nm, próximo ao visor da câmara escura; B: câmara escura fechada; C: câmara escura com porta aberta.

3.7 Análise de dados

A análise quantitativa das amostras foram realizadas após o preparo da amostra e 24 horas depois da submissão à luz, mediante uso da leitora de microplacas modelo LMR-96 da marca Locus a 630 nm, para averiguar o efeito da luz no crescimento bacteriano, cada amostra foi comparada com o grupo controle. Também foi acrescentado 20 μL do corante azul Resazurina à cada amostra para análise qualitativa, o qual é redutível resorufina em caso de crescimento bacteriano, apresentando uma cor rosa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

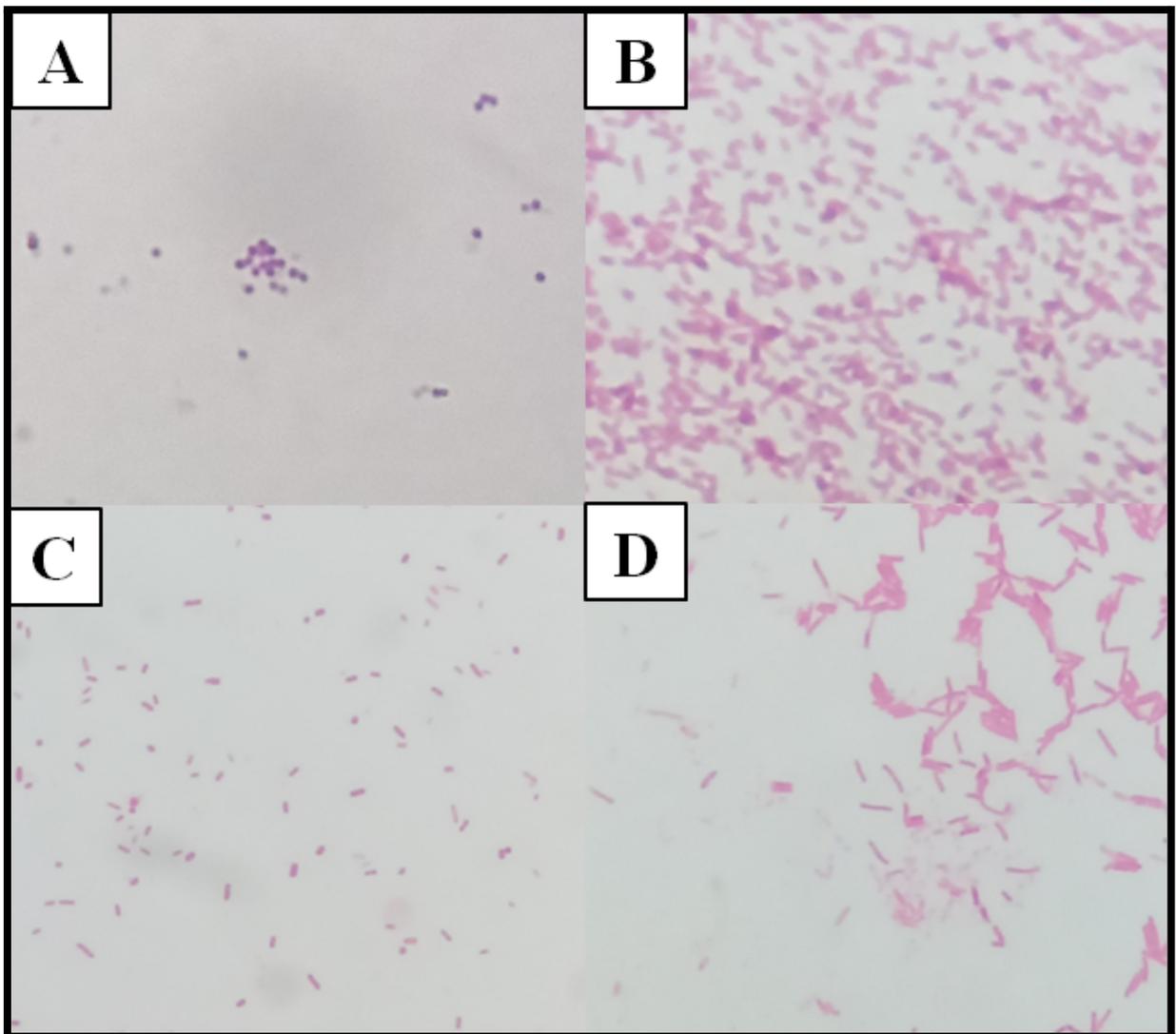
4.1 Reativação e cultivo dos microrganismos

A reativação das espécies *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *P. mirabilis* ocorreu conforme descrito (item 3.1), após 24 horas foi possível observar a formação de colônias nas placas. Porém não houve crescimento das espécies *S. epidermidis* e *S. pneumoniae*. Portanto o experimento ocorreu apenas com as quatro espécies reativadas.

4.2 Coloração de Gram

Na Figura 7 é possível observar o resultado da coloração de Gram, o qual demonstrou pureza das cepas. Após a coloração é possível perceber que as espécies Gram (-): *E. coli*, *P. aeruginosa* e *P. mirabilis* coram em rosa e a bactéria Gram (+) *S. aureus* cora em roxo.

Figura 7: Coloração Gram de *Staphylococcus aureus* (A); *Pseudomonas aeruginosa* (B); *Proteus mirabilis* (C); *Escherichia coli* (D)



Fonte: A autora, 2023

4.3 Fotossensibilizante

Durante a preparação do FS, inicialmente os extratos foram redissolvidos em álcool P.A, porém durante um teste piloto, esse solvente demonstrou ser tóxico às bactérias. Após isso, foram testadas diferentes concentrações de álcool, diluído para 60%, 50% e 40%, porém,

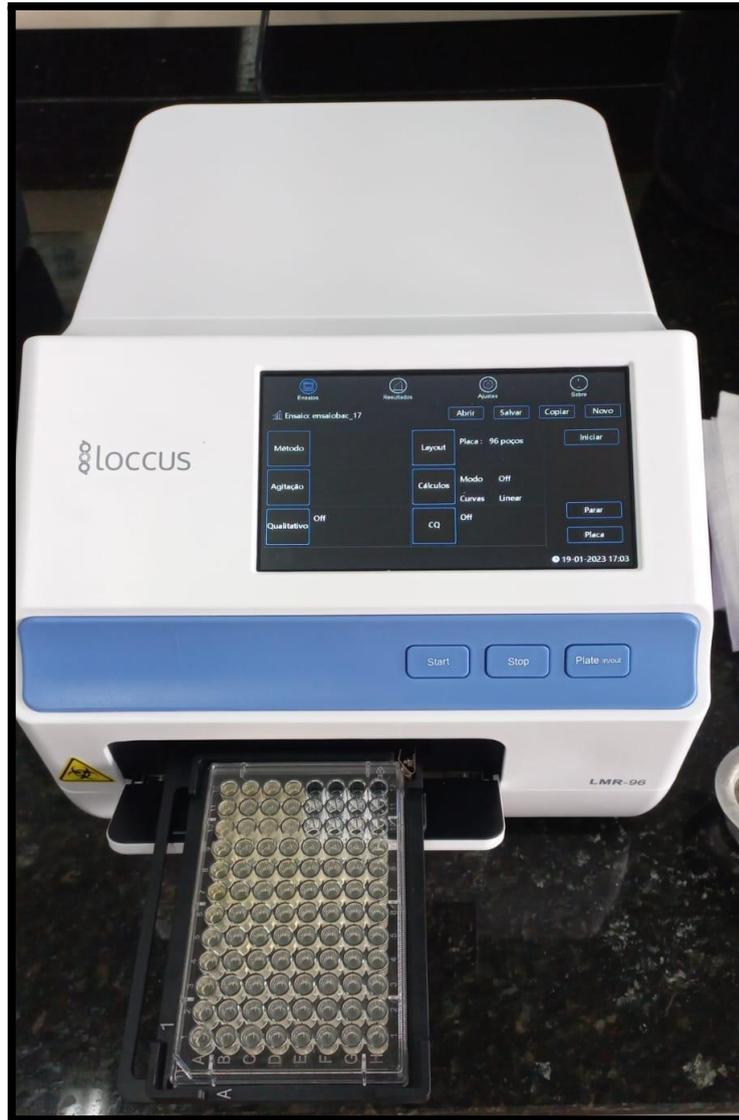
nestas concentrações não houve diluição do extrato, tornando o solvente inviável para o uso nesta pesquisa.

Foi consultada a literatura e encontrado no trabalho de Chapaval (2018), com testes de toxicidade de diferentes solventes e concentrações em diluições de bactérias. Com isso, foram realizados testes para averiguar se haveria diluição do extrato. A partir disso foi testado DMSO a 10%, e após 20 minutos não houve diluição, possivelmente a diluição não ocorreu devido a diferenças de característica, o DMSO é uma substância hidrossolúvel e os extratos são lipossolúveis (ANSELMO, et al. 2008). Outra opção foi testar o solvente Tween 80 diluído a 20%, o qual demonstrou dissolução rápida do extrato e foi atóxico para as células.

4.4 Avaliação da TFD

Após o preparo das amostras, elas foram verificadas em leitora de microplaca (Figura 8) para averiguar o valor da absorbância e em seguida submetidas à luz UV em câmara escura, que passado os tempos determinados foram incubados a 37 °C por 24 horas.

Figura 8: Leitora de microplaca *Loccus* LMR-96 em uso



Fonte: A autora, 2023

Os valores de absorbância antes e pós-experimentos foram organizados para análise e comparados em relação ao grupo “Placa Controle” (PC), que foram condições em que não foi fornecido luz, a fim de verificar se houveram os efeitos esperados. As tabelas abaixo apresentam os resultados obtidos após a leitura das microplacas, e as indicações de crescimento bacteriano (-) são correspondentes aos resultados comparados aos poços nas PCs de cada uma das espécies.

Quadro 1: Avaliação do efeito da TFD em *Proteus mirabilis*

--

Avaliação da TFD - <i>Proteus mirabilis</i>											
Com extrato de <i>B. orellana</i>						Com extrato de <i>A. oleracea</i>					
Condições		mg/mL	1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000	
254 nm	30 min	0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	
		0,055	+	+	+	+	+	+	+	+	
		0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Sem extrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000	
	60 min	0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		0,055	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		0,1	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Sem extrato		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000		
365 nm	30 min	0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	
		0,055	+	+	+	+	+	+	+	+	
		0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Sem extrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000	
	60 min	0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		0,055	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sem extrato		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000		
Placa Controle	0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	0,055	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Sem extrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Fonte: A autora, 2023

Legenda: em (+) indica que houve redução do crescimento bacteriano. Em (-) indica que houve crescimento bacteriano

Ao analisar os valores de absorvância, é encontrado que para esta espécie os valores de absorvância na PC sem o extrato multiplicaram-se intensamente, e nas amostras com aplicação do FS ocorreu uma redução. E nas placas submetidas ao experimento, apesar de ter ocorrido redução nos valores das amostras com FS em comparação às amostras de controle (sem extrato), os valores ainda são menores em comparação aos da PC. Outro resultado observado foi que nas amostras sem extrato submetidas à luz ao serem comparadas às correspondentes na PC, a exposição à luz causou uma redução nos valores de absorvância.

Quadro 2: Avaliação do efeito da TFD em *P.aeruginosa*

Avaliação da TFD - <i>psedomonas aeruginosa</i>										
Com extrato de <i>A. oleracea</i>						Com extrato de <i>A. oleracea</i>				
Condições		mg/mL	1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000
254 nm	30 min	0,01	+	+	+	+	+	+	+	-
		0,055	-	+	+	+	-	-	+	-
		0,1	+	+	+	+	-	-	-	+
		Sem extrato	-	-	-	-	-	-	-	-
			1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000
	60 min	0,01	-	-	-	-	+	-	+	-
		0,055	-	-	-	-	+	-	-	-
		0,1	-	-	-	-	+	-	+	+
Sem extrato		-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000	
365 nm	30 min	0,01	-	+	-	-	+	+	+	+
		0,055	+	+	-	-	-	-	-	-
		0,1	+	-	-	-	-	-	-	+
		Sem extrato	+	+	+	-	+	+	+	-
			1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000
	60 min	0,01	-	-	-	+	+	+	+	+
		0,055	-	+	-	-	+	-	+	-
		0,1	-	-	-	-	-	-	+	+
Sem extrato		+	-	-	-	+	-	-	-	

		1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000
Placa Controle	0,01	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,055	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,1	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sem extrato	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: A autora, 2023

Legenda: em (+) indica que houve redução do crescimento bacteriano. Em (-) indica que houve crescimento bacteriano

A análise desses dados revela que a *P. aeruginosa* não sofreu redução do crescimento bacteriano na maioria das condições fornecidas, e os extratos apresentaram esses efeitos inibidores em condições alternadas, o de *B. orellana* inibiu em 254 nm na aplicação de 30 minutos a maioria das concentrações testadas de bactérias e o de *A. oleracea* apenas em 1:100 a 365 nm durante 60 minutos.

Quadro 3: Avaliação do efeito da TFD em *E. coli*

Avaliação da TFD - <i>Escherichia coli</i>										
Com extrato de <i>B. orellana</i>						Com extrato de <i>A. oleracea</i>				
Condições	mg/mL	1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000	
254 nm	30 min	0,01	+	-	-	-	-	-	-	-
		0,055	+	-	-	-	-	-	-	-
		0,1	+	-	-	-	-	-	-	-
		Sem extrato	+	+	-	-	+	+	-	-
			1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000
	60 min	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
		0,055	+	-	-	-	-	-	-	-
		0,1	+	-	-	-	-	+	+	-
Sem extrato		+	+	-	-	+	+	-	-	
		1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000	
365 nm	30 min	0,01	+	-	-	-	-	+	+	+
		0,055	+	+	+	+	-	-	-	-
		0,1	+	+	+	+	-	-	+	+

		Sem extrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000	
	60 min	0,01	+	-	-	+	+	-	+	+	
		0,055	+	-	+	+	-	-	-	+	
		0,1	+	-	+	+	-	-	-	+	
		Sem extrato	+	+	+	+	+	+	+	+	
			1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000	
Placa Controle		0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	
		0,055	+	+	+	+	+	+	+	+	
		0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Sem extrato	-	-	-	-	-	-	-	-	

Fonte: Arquivo pessoal

Legenda: em (+) indica que houve redução do crescimento bacteriano. Em (-) indica que houve crescimento bacteriano

Nesta tabela é possível observar que as placas com aplicação de extrato de *B. orellana* resultaram em maior inibição se comparado ao de *A. oleracea*. E também é interessante notar que a concentração mais elevada de 1:1 sofreram em maioria efeito inibitório, porém os poços sem extrato também demonstraram inibição no crescimento, indicando que a luz também interferiu no crescimento.

Quadro 4: Avaliação do efeito da TFD em *S. aureus*

Avaliação da TFD - <i>Staphylococcus aureus</i>										
Com extrato de <i>B. orellana</i>						Com extrato de <i>A. oleracea</i>				
Condições	mg/mL	1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000	
254 nm	30 min	0,01	+	+	+	+	+	+	+	
		0,055	-	-	+	+	+	+	+	
		0,1	-	+	+	+	+	+	+	
		Sem extrato	+	+	+	+	+	+	+	+
			1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000

	60 min	0,01	+	+	-	-	-	-	-	+	
		0,055	+	+	-	-	-	-	-	-	
		0,1	-	+	-	-	-	-	-	-	
		Sem extrato	+	+	+	+	+	+	+	+	
			1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000	
365 nm	30 min	0,01	+	+	-	-	+	+	+	+	
		0,055	+	+	+	+	+	-	+	-	
		0,1	-	+	+	+	+	+	+	-	
		Sem extrato	+	+	+	-	+	+	+	+	
			1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000	
	60 min	0,01	+	+	+	+	+	+	+	-	+
		0,055	+	-	-	+	+	+	+	+	-
		0,1	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Sem extrato		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000		
		1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000		
Placa Controle	0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	0,055	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Sem extrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Fonte: A autora, 2023

Legenda: Em (-) indica que houve redução do crescimento bacteriano; Em (+) indica que houve crescimento bacteriano

A Tabela 4 apresenta os resultados do teste com *S. aureus* em que é possível notar que o tempo de 30 minutos aparentou ser mais satisfatório para a inibição das bactérias. Ao comparar todas as Tabelas, nota-se que a espécie *P. mirabilis* foi a mais sensível aos testes, ao sensibilizante e também à luz nos dois comprimentos de onda empregados.

Os resultados, em geral, demonstraram efeitos de inibição quando comparados aos poços “sem extrato”. Ou seja, ao analisar somente os valores de absorbância nas microplacas individualmente (incluindo a PC), foi encontrado que em poços com FS os valores foram menores quando comparados aos dos poços “sem extrato”. Isso indica que ocorreu efeitos de inibição de crescimento bacteriano devido à aplicação do FS. Além disso, ao comparar os

valores na placa de teste com a PC de cada espécie, os resultados apresentados em (+) apontam quando houve crescimento bacteriano em comparação às condições correspondentes em que não houve submissão à luz UV.

E ainda ao avaliar os resultados dos poços “sem extrato” da PC em comparação aos poços correspondentes em outras placas, nota-se que também houve redução no crescimento bacteriano, indicando que somente a aplicação da luz ocasionou um pequeno efeito de inibição.

Os resultados obtidos para os comprimentos de onda utilizados, 254nm e 365nm mostraram-se positivos, principalmente com a espécie *P. mirabilis*, pois ambos demonstraram efeito bacteriostático, mas não foi observado efeito bactericida. O resultado de efeito bacteriostático pôde ser averiguado mediante a utilização da Resazurina, pois ao verificar nos valores de absorbância que houve redução no crescimento bacteriano (quando comparadas à Placa Controle) em todas as placas foi indicado atividade bacteriana, devido todas alterarem a coloração de azul para cor de rosa. Ou seja, havia ainda células vivas e que estavam metabolizando os nutrientes do meio, porém as mesmas não estavam mais se multiplicando, o que indica um estado de bacteriostase (TORTORA, 2017). Para efeito bactericida, a cor da Resazurina após 1 hora de sua aplicação deveria permanecer azul, o que não ocorreu, portanto os testes não causaram efeito bactericida (Figura 9).

Figura 9: Resultado da Resazurina após 1 hora da aplicação



De acordo com a literatura, a depender do fotossensibilizante utilizado, são aplicados diferentes comprimentos de onda de luz devido às características de cada corante, por absorverem diferentes comprimentos de onda (MAIA, et al. 2021). Com relação à *Bixa orellana* o comprimento de onda utilizado por Dias et al. (2008) foram na faixa de 440 a 503 nm, os quais demonstraram serem picos de absorção a depender do solvente em que foram diluídos. Eles utilizaram como FS o azul de metileno a 0,005%, porém a concentração de bactérias não foi especificada, pois foram procedimentos odontológicos realizados diretamente na língua dos pacientes para tratamento de halitose, portanto, grande concentração de bactérias. Os mesmos autores não citam o uso de Tween 80. Gonçalves et al (2018) também utilizou extrato de urucum com concentração de 20% como fotossensibilizante na TFD, os comprimentos utilizados foram na faixa de luz azul, a 395nm e 480nm, e também demonstraram efeitos satisfatórios.

Os comprimentos de onda dos estudos mencionados foram diferentes dos utilizados nesta pesquisa, porém os resultados indicam efeitos positivos apesar de não haver unanimidade nos testes com todas as espécies. Considerando o trabalho de Galo (2018), os comprimentos de onda mais susceptíveis a efeitos inibitórios foram de 380 nm a 500nm, correspondentes à luz azul, em meio de cultura líquido, sem a utilização de FS. É conhecido que a luz ultravioleta possui efeito fotodinâmico com microrganismos em superfície em meio sólido (SILVA, et al. 2017), e se observou que em meio líquido também ocorre um efeito, porém não foi em todas as amostras que houve redução no crescimento das bactérias.

Além disso, ao considerar os trabalhos realizados por Romero et al. (2021), Vale et al. (2021), Labban (2020) e Golçanves (2017), citados por Maia et al. (2021), que realizaram trabalhos com a terapia fotodinâmica como tratamento de halitose, utilizaram os mesmos protocolos durante os experimentos, com comprimentos de onda na faixa de luz azul e vermelha, mas com tempo para análise dos dados diferentes, que averiguaram em 90 dias e 30 dias. O resultado foi que apenas Golçanves (2017) encontrou resultados positivos como efeito da TFD, que determinou menor tempo para analisar a redução no crescimento de bactérias, diferente dos demais autores, após a aplicação da TFD. Isto indica que mesmo que se utilizem os mesmos protocolos, as variáveis utilizadas e as condições das bactérias são determinantes para os resultados. Essas condições indicam porque houve resultados muito satisfatórios com *P. mirabilis* e menos eficácia com *P. aeruginosa*.

Galo (2018) utilizou como distância 1 cm entre o LED e o meio de cultura com os microrganismos, com potência conhecida de densidade de energia emitida sobre as amostras. Neste trabalho a distância utilizada foi de 15 cm e não é conhecido a potência emitida sobre as amostras, é possível que a uma distância menor poderia haver inibição de crescimento bacteriano em mais amostras.

Ronqui (2015) estudou o efeito da TFD com FS e luz vermelha, a qual segundo os estudos de Galo (2018) apenas possui efeitos positivos na TFD devido o emprego de FS. Em seu estudo, a autora não especificou a distância entre as microplacas e o LED, porém destacou o tempo de submissão foi de 25 minutos e seus resultados foram positivos, o que corrobora com os resultados encontrados neste trabalho. Deve ainda ser considerado que o comprimento de onda utilizado por Ronqui (2015) também foi diferente, junto com o FS, que possui efeito potencial conhecido. Também é conhecido que extrato de *B. orellana* possui capacidade de reagir com a luz e gerar radicais livres com o oxigênio disponível, e dependendo do solvente, os comprimentos de onda absorvidos são diferentes (COUTINHO et al, 2016). Não há registro do uso de extrato de *A. oleracea* como fotossensibilizante e os resultados demonstram que apenas a aplicação do FS possui efeito inibitório, observado na PC.

Portanto, a literatura indica que os protocolos utilizados são determinante para os resultados referentes à TFD, e que variáveis como o tempo de submissão, o comprimento de onda utilizado (o qual foi na faixa de ultra violeta), a distância entre o emissor de luz e a amostra, a potência dessa luz e o fotossensibilizante utilizado quanto a sua característica e concentração são fatores que influenciam na resposta ao TFD (MYLONA et al., 2020).

Dessa forma, pode ser respondida a pergunta inicial do trabalho “como utilizar a terapia fotodinâmica como alternativa a antibióticos?”. Ao utilizar a técnica de TFD em processos de cicatrização em feridas, conforme estudo de Guanabara (2017), a TFD atua como antimicrobiano, para reduzir a proliferação das bactérias, e conforme os resultados obtidos, o efeito provocado foi bacteriostático, assim, as bactérias não possuirão mais a capacidade de se multiplicar e provocar inflamações em feridas infectadas. E em outras condições como as utilizadas pelos autores consultados também contribuem para mais protocolos e possibilidades do uso da técnica. Porém, como indicado por Galo (2018), a aplicação sequencial da TFD sob colônias de bactérias é capaz de causar, em longo prazo, a resposta de resistência de bactérias. Portanto, conforme determinado por Maia et al. (2021) o

cuidado do paciente com as feridas devem ser orientados, para auxiliar no tratamento e obter-se resultados positivos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho avaliou-se que os extratos naturais de *B.orellana* e *A. oleracea* submetidos à luz UV nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm apresentaram efeito inibitório no crescimento das bactérias, que não foi observado em todas as amostras estudadas quando comparadas a Placa Controle. Apesar disso, os resultados ainda indicaram valores menores quando comparadas aos poços sem extrato. Além disso, a luz também causou efeito inibitório nas amostras sem aplicação de FS.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, R.R; AMORIM, J.C.F; NUNES, E; SOARES, J.A; SILVEIRA, F.F. Terapia Fotodinâmica na Endodontia – revisão de literatura. **RFO**. v. 15, n. 2, p. 207-211. Passo Fundo, 2010.
- ANSELMO, G.C.S. Comportamento higroscópico do extrato seco de Urucum (*Bixa orellana* L.). **Ciências e Agrotécnicas**. v. 32, n. 6, p. 1888-1892, 2008.
- ASSIS, A.A.R. **Estudo de “*Mycobacterium phlei* (ATCC 11758) como Agente Agregante para Hematita e Quartzo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica). Escola de Engenharia da Universidade de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2007. P. 102. Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/MAPO-7R5JQ7>> Acesso em: 08 de dez. de 2021
- BAK, J; LADEFOGED, S.D; TVEDE, M; BEGOVIC, T; GREGERSEN, A. Desinfection of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm contaminated tube lumens with ultravioleta C light emitting diodes. **Biofouling: The journal of Bioadhesion and biofilm Research**. V. 26, n. 1, p. 31-38, 2010.
- BENVINDO, R.G; BRAUN, G; CARVALHO, A.R; BERTOLINI, G.R.F. Os efeitos da terapia fotodinâmica e de uma única aplicação de laser de baixa potência em bactérias *in vitro*. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 15, n. 1, p. 53-57, 2007.
- BRANDÃO, M.G.S.A; XIMENES, M.A.M; CRUZ, G.S; BRITO, E.G.S; VERAS, V.S; BARROS, L.M; ARAÚJO, T.M. Terapia Fotodinâmica no tratamento de feridas infectadas nos pés de pessoas com diabetes mellitus. **Enfermagem Atual In Derme**. p. 138-145, 2020.
- CHAPAVAL, L. **Concentração inibitória mínima de solventes na diluição de extratos vegetais com potencial antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus***. 1º edição. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2018.
- COUTINHO, M.A.S. SILVA, E.C; ALVES, A. L; MATOS, A.Z.G; VIANA, V.G.F. Determinação da eficácia de diferentes solventes orgânicos na dissolução do corante natural bixina extraído das sementes do urucum (*Bixa orellana* L). In: **Congresso Brasileiro de Química, 56, 2016, Belém**. Anais. Belém, 2016.

DEMIDOVA, T.N; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**. v. 17, n. 3, p. 245-254. 2004.

EDUARDO, C.P; BELLO-SILVA, M.S; RAMALHO, K.M; LEE, E.M.R; ARANHA, A.C.C. A terapia fotodinâmica como benefício complementar na clínica odontológica. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**. v. 69, n.3, p.226-235, 2015.

GALO, I.D.C. **Fototerapia antimicrobiana: otimização de protocolo experimental in vitro e estudo de resistência bacteriana**. Dissertação (Mestrado em Ciências aplicadas à Saúde). Universidade Federal de Goiás. Unidade Acadêmica Especial de Ciências da Saúde. Jataí, p. 92, 2018. Disponível em: < <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/8805>> Acesso em: 10 de fev. de 2023.

GUANABARA, L.C.R; MOURA, T.B; SANTOS, D.R. Fototerapia por radiação laser e LED na Terapia Fotodinâmica na inibição de proliferação bacteriana no processo de cicatrização. **Universidade de Ribeirão Preto**. Guajará, 2017. P. 17.

GONÇALVES, G; MOTA, A; DEANA, A; GUEDES, G; CAVALCANTE, L; PRATES, R; HORLIANA, A; PAVANI, C; MOTTA, L; BITENCOURT, G; FERNANDES, K; SALGUEIRO, M; MESQUITA-FERRARI, R; SILVA, D; FRANÇA, C; BUSSADORI, S. Photodynamic therapy with *Bixa orellana* extract and LED for the reduction of halitosis: study protocol for a randomized, microbiological and clinical trial. **Trials**. V. 19, n. 1, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6206672/>> acesso em: 10 de fev. de 2023.

GONÇALVES, M.L.L; BUSSADORI, S.K; FRAGOSO, Y.D; DA SILVA, V.V.B; DEANA, A.M; DA MOTA, A.C.C; FRANÇA, C.M. Efeito da terapia fotodinâmica na redução da halitose em pacientes com esclerose múltipla: ensaio clínico. **Journal of breath research**. V. 11, N. 4. 2017.

GOOL, A.S; FARIA, M.G.I. Resistência bacteriana como consequência do uso inadequado de antibióticos. **Brazilian Journal of surgery and Clinical Research**. v. 5, n. 1, p. 69-72, 2013.

MAIA, I.M.S; SALES, D.F.S; GODOY, A.B; ALVES, F.F; SILVA, A.O; BARROSO, M.L.F; RANGEL, D.A.R.M; AGUIAR, M.C.A; FERNANDES, D.R.L. Terapia fotodinâmica como coadjuvante no tratamento de halitose de origem bucal: revisão narrativa de literatura. **Research, Society and Development**. v. 10, n. 15, 12 p. 2021.

MOLINARO, E.M. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. v. 1. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2009.

MYLONA, V; ANAGNOSTAKI, E; PARKER, S; CRONSHAW, M; LYNCH, E; GROOTVELD, M. Laser-assisted aPDT protocols in randomized controlled clinical trials in dentistry: a systematic review. **Dentistry Journal**, v. 8, n° 3. 26 p. 2020.

NASCIMENTO, L.E.S. **Jambu (*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen) Hidropônico e convencional: uma comparação baseada nas propriedades físico-químicas e composição fitoquímica**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Alimentos). Programa de Pós-Graduação do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2019. P. 129. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/215239>> Acesso em: 8 de dez. de 2021.

PERUSSI, J.R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Quim. Nova.** V. 30, nº 4, p. 988-994. São Paulo, 2007.

PINTO, G.C.S. **Eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana em biofilmes de *Staphylococcus aureus* suscetíveis e resistente à meticilina.** Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral). Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de Araraquara. P. 120. Araraquara, 2013. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/97310/pinto_gcs_me_arafo.pdf?sequence=1> acesso em: 8 de dez. de 2021.

ROMERO, S.S; VALE, K.L; REMOLINA, V.G, SILVA, T.G, SCHALCH, T.O, RAMALHO, K M; HORLIANA, A.C.R.T. (2021). Higiene oral associada à terapia fotodinâmica antimicrobiana ou raspador lingual na redução da halitose após 90 dias de acompanhamento: Um estudo randomizado, controlado, únicocego. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.** V. 33, 2017.

RONQUI, M.R. **Eficiência da Terapia Fotodinâmica em *Staphilococcus aureus* e *Escherichia coli*.** Dissertação (Mestrado em Biociência e Biotecnologia Aplicada a Farmácia) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual “Júlio Mesquita Filho”. Araraquara, p. 142, 2015. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/126569/000840266.pdf;jsessionid=A9FC7A21B600F64BF233D90A3FED5EB2?sequence=1>> Acesso em: 8 de dez. de 2021.

SANTANA, L.M.D. **Potencial da terapia fotodinâmica antimicrobiana no desenvolvimento de resistência em *Candida albicans*.** Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral). Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral na área de Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2020. P. 28. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/192633/santana_lmd_me_arafor_par.pdf?sequence=7&isAllowed=y> Acesso em 08 de dez. de 2021.

SERRA, J; DUARTE, C; TEIXEIRA, P.R; FRANCHINI, M. **Técnica de Coloração de Gram. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS.** 63 p. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

SILVA, A.L; SERRA, E.F; RIPOLL, M.K; WALLER, S.B; OSÓRIO, L.G; GOMES, A.R; FARIA, R.O; MEIRELES, M.C.A. Luz ultravioleta na inibição do crescimento de leveduras. **Science and animal health.** V. 5, n. 2, p. 101-111. Pelotas, 2017.

SIQUEIRA, et al. Potencial fotossensibilizante de extratos de plantas do agreste na técnica de terapia fotodinâmica. **Faculdade de Odontologia de Lins.** v. 28, n. 2, p. 27-38. Pernambuco, 2018.

TEIXO, R.J.M. **Terapia Fotodinâmica: Uma Abordagem no Retinoblastoma.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra. Coimbra, p. 163. 2013. Disponível em: <<https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/24713/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20-%20Terapia%20fotodin%C3%A2mica%20-%20uma%20abordagem%20no%20retinoblastoma%20-%20Ricardo%20Teixo.pdf>> Acesso em: 8 de dez. de 2021.

TORTORA, G; FUNKE, B; CASE, C.L. **Microbiologia.** 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

VERÍSSIMO, S.A. **Extração, caracterização e aplicação do corante de urucum (*Bixa orellana* L.) no tingimento de fibras naturais.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, p. 99, 2003. Disponível em: < <https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/15862/1/SilvagnerA.pdf> > Acesso em: 8 de dez. de 2021.

VILELA, S.F.G. **Ação de diferentes fotossensibilizadores na Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.** Dissertação (Mestrado em Biopatologia bucal) Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". São José dos Campos, p. 79. 2010. Disponível em: < https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/94778/vilela_sfg_me_sjc.pdf?sequence=1 > Acesso em: 8 de dez. de 2021.