

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS AMBIENTAIS**

GUILHERME KYU FABRIS HASEGAWA

**ESTUDO DA POTENCIALIDADE DA TERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA (TFDA) NA DESINFECÇÃO DE ÁGUA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**CURITIBA
2012**

GUILHERME KYU FABRIS HASEGAWA

**ESTUDO DA POTENCIALIDADE DA TERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA (TFDA) NA DESINFECÇÃO DE ÁGUA**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais do Departamento Acadêmico de Química e Biologia – DAQBI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo.

Orientador: Prof.^a Dra. Adriane Martins de Freitas

Co-orientador: Prof.^a Dra. Marlene Soares

**CURITIBA
2012**

GUILHERME KYU FABRIS HASEGAWA

**ESTUDO DA POTENCIALIDADE DA TERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA (TFDA) NA DESINFECÇÃO DE ÁGUA**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de TECNÓLOGO EM PROCESSOS AMBIENTAIS pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela seguinte banca examinadora:

Membro 1 – Prof^a. Dr^a. Wanessa Algarte Ramsdorf
Departamento Acadêmico de Química e Biologia, (UTFPR)

Membro 2 – Prof^a. Dr^a. Cláudia Regina Xavier
Departamento Acadêmico de Química e Biologia, (UTFPR)

Orientadora – Prof^a. Dr^a. Adriane Martins de Freitas
Departamento Acadêmico de Química e Biologia, (UTFPR)

Coordenadora de Curso – Prof^a. Dr^a. VALMA MARTINS BARBOSA

Curitiba, 18 de dezembro de 2012.

*Faça todo o bem que puder,
Por todos os meios que puder,
De todas as maneiras que você pode,
Em todos os lugares que você puder,
Em todas as vezes que você puder,
Para todas as pessoas que você puder,
Enquanto você pode sempre.*

John Wesley

Aos meus pais Célio e Doracy que me ensinaram as palavras valores e caminho, e a com elas me deixaram livre para eu tomar minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre do meu lado, iluminando os meus pensamentos e me ajudando em minha caminhada.

Agradeço aos Anjos de luz que me acompanharam e me ajudaram nos momentos de maior dificuldade e nos momentos de felicidade.

Agradeço aos meus Pais que com amor e carinho me criaram e ensinaram os verdadeiros valores da vida.

Agradeço aos meus amigos pelo companheirismo e dedicação, seja em escutar seja em discutir, mas que sempre estiveram junto comigo.

Agradeço a minha Orientadora, pela paciência e persistência me aguentando todo este tempo, pelos puxões de orelha e pelos conselhos.

Agradeço aos meus professores que foram a base de conhecimento e sabedoria para minha construção.

Agradeço a todos que contribuíram para o meu sucesso, que contribuíram para o meu bem.

RESUMO

HASEGAWA, Guilherme Kyu Fabris. Estudo da potencialidade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) na desinfecção de água. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

A água é um dos elementos fundamentais para a existência de todos os seres vivos. Porém, é possível comprometer sua qualidade por influência antrópica, tornando as águas veiculadoras de doenças devido à existência de microrganismos (muitos deles patogênicos). A fim de sanar esses problemas, é feito o tratamento dessa água de várias formas, como através da utilização de produtos químicos ou de processos físicos. A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) se baseia na junção desses dois procedimentos: uma fonte de luz (meio físico) e um fotossensibilizador (meio químico). O fotossensibilizador adicionado à amostra disposta em béqueres foi irradiado a partir de lâmpadas LED, o qual se excita e gera espécies reativas de oxigênio e estas, por sua vez, geram um estresse oxidativo resultando na morte microbiana. Com o objetivo de verificar o potencial da TFDA na desinfecção de águas contaminadas com *Escherichia coli*, utilizando diferentes fotossensibilizadores, foram realizados testes para determinar as melhores concentrações do fotossensibilizador para uso experimental. Dos tempos de exposição da radiação, frente às concentrações utilizadas, os melhores resultados foram obtidos com as concentrações de 1000µMol/L de azul de metileno e 250µMol/L de verde malaquita, no tempo de 15 minutos.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. *Escherichia coli*. Fotossensibilizador. Desinfecção de Água. Azul de Metileno. Verde Malaquita.

ABSTRACT

HASEGAWA, Guilherme Kyu Fabris. Study of potentiality of Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT) in disinfecting of water. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

Water is a fundamental element for the existence of all living beings. However, it's possible compromise its quality by anthropogenic influence, making the water carrier diseases due to the existence of microorganisms (many of these, pathogenic). To end these problems, the treatment of water has been done in various ways, such as using chemical or physical processes, for example. Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT) is based on the combination of these two procedures: a light source (physical) and a photosensitizer (chemical). The FS added to the sample prepared in beakers was irradiated from LED bulbs, which excites and generates reactive oxygen species and these, in turn, generate an oxidative stress causing microbial death. Aiming to verify the potential of antimicrobial photodynamic therapy in the disinfection of water contaminated with *Escherichia coli*, using different photosensitizers, were performed tests to determine optimal concentrations for experimental use. From the radiation exposure times, compared to the concentrations used, the best results were obtained with concentrations of 1000 μ Mol/L of methylene blue and 250 μ Mol/L of malachite green at the time of 15 minutes.

Keywords: Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Escherichia coli*. Photosensitizer. Disinfection of Water. Methylene Blue. Malachite Green.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação da parede celular de bactéria gram-positiva (+) e gram-negativa (-)	18
Figura 2 – Mecanismos de geração de EROs pela combinação de luz, fotossensibilizador e oxigênio no estado fundamental	20
Figura 3 – Diagrama de Jablonski	21
Figura 4 – Representação da estrutura química da molécula do Verde malaquita ...	23
Figura 5 – Representação da estrutura química da molécula do Azul de metileno...	23
Figura 6 – Esquema da fotoquímica do azul de metileno.....	24
Figura 7 – Fluxograma da diluição da cepa.....	27
Figura 8 – Comparação visual – escala Mc Farland	29
Figura 9 – Foto da lâmpada de led utilizado.....	30
Figura 10 – Foto do bocal e27 fixado no suporte universal: sistema de irradiação ...	30
Figura 11 – Esquema segmentado para medição de luz	31
Figura 12 – Esquema da construção do teste da IFDA.....	33
Figura 13 – Fluxograma dos procedimentos de preparo de cepa para os testes efetivos da IFDA	33
Figura 14 – Curva de padronização do inóculo: absorvância x concentração	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros empregados durante os períodos de radiação da suspensão bacteriana.....	31
Tabela 2 – Valores de iluminância referente à radiação emitida pela lâmpada.....	35
Tabela 3 – Relação entre concentração de AM e taxa de inibição, frente a <i>E.coli</i>	37
Tabela 4 – Relação entre concentração de VM e taxa de inibição, frente a <i>E.coli</i>	38
Tabela 5 – Caracterização dos testes da IFDA com a utilização do AM como FS na concentração de 1000µmol/L	39
Tabela 6 – Caracterização dos testes da IFDA com a utilização do VM como FS na concentração de 100µmol/L	40
Tabela 7 – Caracterização dos testes da IFDA com a utilização do VM como FS na concentração de 250µmol /L	40

LISTA DE SIGLAS, ABREVIACOES E SÍMBOLOS

TFDA	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
PDT	Terapia Fotodinâmica (TFD) do termo: <i>Photodynamic Therapy</i>
PS	Fotossensibilizador (FS) do termo: <i>Photosensibilisator</i>
APDI	Inativao Fotodinâmica Antimicrobiana (IFDA) do termo: <i>Antimicrobial Inactivation Photodynamic</i>
LED	Diodo emissor de Luz do termo: <i>Light Emitting Diode</i>
LASER	Amplificao da Luz por Emissão Estimulada de Radiao do termo: <i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
ERO	Espécie Reativa de Oxignio
AM	Azul de Metileno
VM	Verde de Malaquita
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
PCA	gar Contagem de Placas do termo: <i>Plate Count Agar</i>
BHI	Infusão de cérebro e corao do termo: <i>Brain Heart Infusion</i>
SS	Soluo Salina
UFC	Unidades Formadoras de Colnia
Mol	Unidade de base do Sistema Internacional de Unidades (SI) para a grandeza quantidade de matéria
ml	Mililitro
μ s	Microsegundo (10^{-6} segundos)
μ m	Micrmetro (10^{-6} metros)
nm	Nanmetro (10^{-9} metros)
C	Graus Celsius
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

DAQBI Departamento Acadêmico De Química E Biologia

DAFIS Departamento Acadêmico De Física

λ Lâmbda: comprimento de onda

θ Teta: medida de um ângulo

UV Radiação Ultra Violeta

cd Candela: unidade de medida básica do Sistema Internacional de Unidades para a intensidade luminosa.

lx Lux: unidade de medida de iluminamento

Cs Conversão interna

Cis Cruzamento intersistema

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	JUSTIFICATIVA	16
3.	OBJTIVOS	17
3.1.	OBJETIVO GERAL	17
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
4.1.	MICROORGANISMOS	18
4.2.	TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (TFDA)	19
4.3.	FOTOSENSIBILIZADORES	22
4.4.	FONTE DE RADIAÇÃO	24
5.	METODOLOGIA	26
5.1.	EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES	26
5.2.	ATIVAÇÃO DA CEPA	27
5.3.	PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	27
5.3.1.	Escala de Mcfarland e Método Turbidimétrico	28
5.4.	SISTEMA DE RADIAÇÃO	30
5.5.	TESTES DE INIBIÇÃO MICROBIANA	31
5.6.	TESTES DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA	32
6.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
6.1.	PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	34
6.2.	SISTEMA DE RADIAÇÃO	35
6.3.	TESTE DE INIBIÇÃO MICROBIANA	36
6.4.	TESTE DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA	38
7.	CONCLUSÕES	44
8.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	45
	REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

A água é um dos elementos fundamentais para a existência de todos os seres vivos, possibilitando que se executem diversas atividades com a sua utilização. Porém, a qualidade dos recursos hídricos pode ficar comprometida por meio da influência antrópica, tornando as águas veículos de doenças devido à existência de microrganismos patogênicos, por exemplo.

Muitos fatores devem ser considerados para a avaliação da eficiência de um sistema de desinfecção de águas, tais como: características e dose do desinfetante, tempo de contato, características da água, característica dos microrganismos e homogeneidade da dispersão do desinfetante na massa líquida (DANIEL *et al.*, 2005).

Como forma de reaproveitamento, águas residuárias são utilizadas para fertilizar as terras agrícolas há muito tempo e esta rotina é praticada em muitas áreas (ERGAIEG e SEUX, 2009). Embora essa reciclagem possa ser uma solução atrativa para demandas crescentes de água em zonas com recursos insuficientes, também levanta a preocupação sobre os riscos de saúde relacionados à contaminação microbiana através de águas residuais.

De acordo com ROSSIN (1987), até 1880, quando surgiu a teoria dos microrganismos causadores de doenças, acreditava-se que os odores eram seus meios transportadores. Assim, na tentativa de se controlar os odores, surgiu a desinfecção tanto da água, como dos esgotos. Com as contribuições de Schwam, Pasteur, Koch e outros cientistas, no avanço dos conhecimentos da bacteriologia e na comprovação da eficiência do cloro para remoção de odor, iniciou-se um grande progresso na tecnologia de tratamento de água.

Os tratamentos convencionais utilizados para desinfecção de efluentes incluem sais de sódio, cloro ou hipoclorito de cálcio, dióxido de cloro, ozônio, radiação ultravioleta e irradiação de luz solar, entre outros. Existe, contudo, certa preocupação sobre a eficácia desses tratamentos, particularmente cloro (SOBSEY, 1989), bem como os riscos químicos associados com a formação de subprodutos de desinfecção. A pesquisa tem, assim, focado na otimização de processos de desinfecção e à busca de métodos alternativos mais eficazes ou ambientalmente amigáveis (ACHER *et al.*, 1997).

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) é uma área de pesquisa em expansão e envolve a combinação sinérgica de um fotossensibilizador, oxigênio molecular e luz de comprimento de onda adequado. Durante o evento fotodinâmico, são produzidas espécies reativas do oxigênio (EROs) que inviabilizam moléculas biológicas presentes ao redor, promovendo efeitos bacteriostáticos e bactericidas (HAMBLIN e HASSAN, 2004).

A TFDA é baseada na utilização de moléculas sensíveis à luz. Estas moléculas são chamadas de fotossensibilizadores, e quando ativadas por luz de comprimento de onda adequado, produzem várias espécies reativas de oxigênio, sendo a principal, o oxigênio singleto. A formação desta e de outras espécies reativas na membrana celular e na membrana de organelas, resulta em inativação e morte celular (HAMBLIN e NEWMAN, 1994).

Todos os fotossensibilizadores têm em comum, um ou mais grupos cromóforos. Grupos cromóforos são os grupos funcionais de uma molécula, que são responsáveis pela absorção de luz visível pela molécula, dando-lhe a sua cor (ATKINS, 1994). A fotoxidação sensibilizada, também referida como fotossensibilização ou ação fotodinâmica, é uma reação fotoquímica indireta muito semelhante à oxidação fotocatalítica. Este processo pode oferecer uma vantagem sobre o processo fotocatalítico, porque os sensibilizadores podem absorver a luz no espectro visível, permitindo a utilização de uma percentagem de luz solar disponível. A fotossensibilização emprega a luz visível (ou até mesmo luz solar), como fonte de energia e o oxigênio dissolvido na água como o agente oxidante (COOPER e GOSWAMI, 1998).

De acordo com PERUSSI (2007) diversos corantes têm sido estudados para a erradicação de microrganismos. Esses corantes pertencem a diferentes grupos de compostos, tais como xantenos halogenados (Rosa de Bengala, Eritrosina), fenotiazídicos (Azul de o-toluidina, Azul de Metileno), triarilmetanos (Verde de Malaquita), acridinas e conjugados de clorin.

O azul de metileno (AM) é uma molécula que tem desempenhado importante papel em microbiologia e farmacologia. É um corante aromático heterocíclico solúvel em água ou em álcool, tem banda de absorção entre 620 e 660 nm de comprimento de onda (vermelho) (EMBLETON *et al.*, 2005). Possui rendimento quântico de formação de oxigênio singleto da ordem de 0,5 e baixo potencial de redução, é um dos corantes mais bem descritos, considerado de baixa toxicidade, que em solução

aquosa, absorve intensamente na região do UV-vis (ultra violeta visível) (λ máx = 664nm) e mostra boa eficiência fotodinâmica na morte de células cancerígenas, podendo ser excitado por luz mono e policromática (LAMBRECHTS *et al.*, 2005).

O verde malaquita (VM) é um corante usado como rotina na clínica odontológica e apresenta a característica de interagir com várias substâncias orgânicas, principalmente com o biofilme oral aderido aos elementos dentais (SOCRANSKY, 1997). Este corante apresenta uma banda de absorção na região vermelha do espectro eletromagnético. Sua molécula é catiônica e pertence à família dos trifenilmetanos com três anéis benzênicos (GOLDING *et al.*, 1998).

As fontes de luz disponíveis para TFDA pertencem a três grandes grupos: LASERs (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation), LEDs (Light Emitting Diode) e as lâmpadas amplo espectro (ISSA e MANELA-AZULAY, 2010). A maioria dos estudos utilizando a TFDA para obtenção de efeito antimicrobiano relata o emprego de LASER de baixa potência.

Entretanto, diversas fontes de luz podem ser usadas na TFDA tópica. A maioria dos estudos clínicos é realizada com luz de comprimentos entre 625 e 633nm, que permitem maior penetração na pele (KALKA *et al.*, 2000).

A maioria dos experimentos com TFDA relatados são realizados utilizando uma cultura pura de microrganismos em suspensão em água deionizada ou purificada (NITZAN *et al.*, 1992). Mas pouco tem sido relatado sobre a resposta à TFDA envolvendo amostras reais de água contaminada com bactérias (MERCHAT *et al.*, 1996; CAMINOS, SPESIA e DURANTINI, 2006). Trabalhos relacionados discorrem sobre o uso de técnicas alternativas para a aplicação do tratamento de água, como utilização de luz UV (HIJNEN, BEERENDONK e MEDEMA, 2006) e radiação solar (MCLOUGHLIN *et al.*, 2004; REED, MANI e MEYER, 2000; VILLE'N *et al.*, 2006), porém pouco se fala sobre TFDA como técnica para esse tratamento.

As águas residuárias antes de serem reutilizadas em suas mais variadas áreas (agricultura, indústria, dentre outras), necessitam de tratamento prévio de desinfecção, pois esta pode se tornar uma fonte de contaminação para o homem que estará envolvido direta ou indiretamente com ela. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo verificar o potencial da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) na desinfecção de águas contaminadas com *Escherichia coli*, utilizando diferentes fotossensibilizadores e lâmpadas tipo LED.

2. JUSTIFICATIVA

A água é um bem natural essencial para o homem e cada vez mais tema de debates no mundo todo. No entanto, no século XIX a água foi reconhecida como meio de transmissão de doenças sendo que os causadores eram muitas vezes, os microrganismos. Além disso, se constatou que seria possível reduzir esse risco através do tratamento da água (ROSSIN, 1987).

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) se lança como um método alternativo eficaz para essa desinfecção, uma vez que apresenta uma ação ampla frente a muitos microrganismos e os recursos necessários são de baixo custo.

Entretanto, poucos são os estudos desenvolvidos frente à descontaminação de água nessa área, pois normalmente tratamentos via terapia fotodinâmica se dão no meio biológico através de tratamento ortodôntico (combate à placa bacteriana), dermatológico (contra acne) e médico (alternativa de tratamento de alguns tipos de câncer) e pouco foi divulgado referente ao meio ambiente e a tratamento de água.

Por isso a importância do trabalho como fonte de conhecimento nesta área tão promissora e ainda pouco explorada, visando um reaproveitamento de águas em várias aplicações (agricultura, reprocessamento, etc.) e como forma alternativa para os tratamentos convencionais (cloração, UV, por exemplo).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo verificar o potencial da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) na desinfecção de águas contaminadas com *Escherichia coli*, utilizando diferentes fotossensibilizadores e lâmpadas tipo LED.

3.2 Objetivos Específicos

- Definir as condições experimentais ideais para execução da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, como: concentração dos fotossensibilizadores, tempo de irradiação, distância lâmpada-amostra e volume de amostra irradiado;
- Avaliar o efeito inibitório tóxico dos fotossensibilizadores nas condições experimentais utilizadas;
- Avaliar a potencialidade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na desinfecção de águas contaminadas com *E. coli*, utilizando Azul de Metileno – AM e Verde de Malaquita – VM como fotossensibilizadores, em reator fotoquímico de bancada e lâmpada tipo LED;
- Comparar o desempenho dos diferentes fotossensibilizadores usados no processo.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Microrganismos

Apesar do considerável progresso que tem sido obtido nos tratamentos de infecções, é preocupante o crescente número de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos no mundo todo (MAISCH *et al.*, 2005), o que, segundo Hamblin e Hasan (2004), pode levar ao fim de um extenso período que inclui os últimos 50 anos, chamado de “era do antibiótico”. As bactérias multiplicam-se rapidamente e uma mutação que ajude um único microrganismo a sobreviver na presença de um antibiótico rapidamente se tornará predominante na população microbiana. Assim, é importante se encontrar novas técnicas antimicrobianas contra a qual a bactéria não seja capaz de desenvolver resistência (DEMIDOVA e HAMBLIN, 2005).

Com relação à eficiência da inativação bacteriana, é conhecido que bactérias Gram-positivas (+) são geralmente mais susceptíveis à Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana (IFDA) e as espécies Gram-negativas (-) são significativamente resistentes a muitos fotossensibilizadores comumente usados em Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) de tumores (MAISCH *et al.*, 2005).

Diferenças na susceptibilidade à TFDA entre espécies de bactéria da mesma classificação Gram dependem de fatores que podem ser peculiaridades das barreiras de permeabilidade das membranas (Figura 1), mas também de diferenças nas enzimas antioxidantes no DNA ou mecanismos de reparo do DNA bem como de fatores simples, tais como tamanho da célula microbiana (DEMIDOVA e HAMBLIM, 2004).

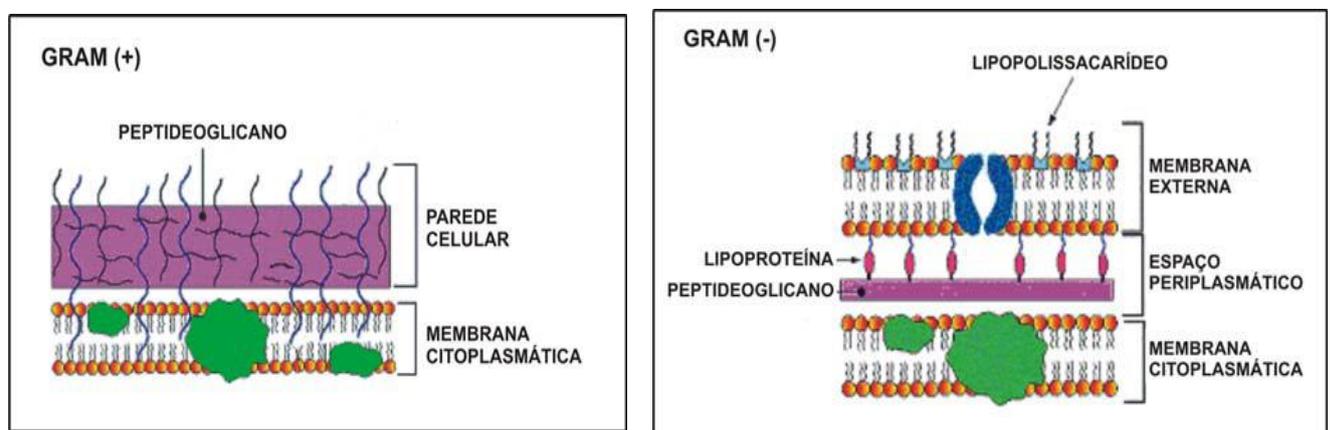


Figura 1: Representação da parede celular de bactéria Gram-positiva (+) e Gram-negativa (-).

(FERRONATO E SALMASO, 2010).

Como grupo de microrganismos utilizados para este estudo, foi adotado a bactéria *Escherichia coli*, por ser um representante do grupo coliforme, de interesse no que diz respeito à qualidade da água.

E. coli é um dos microrganismos experimentais por excelência. É um habitante natural da flora microbiana do trato intestinal de humanos e da maioria dos animais de sangue quente sendo, portanto, encontrado em fezes. São classificados como bastonetes retos, Gram negativos, não formadores de esporos, possuem mobilidade através de flagelos ou são imóveis. São anaeróbios facultativos e utilizam D-glicose e outros carboidratos com a concomitante formação de ácido e gás. São oxidase negativas, catalase positivas e geralmente citrato negativos. Em relação à temperatura de crescimento, a *E.coli* cresce rapidamente entre 30 e 42°C e é tolerante a meio ácido (TORTORA, 2005).

4.2 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA)

O uso de luz e compostos fotossensíveis em humanos é antigo, pois há mais de 4000 anos atrás os egípcios tratavam vitiligo através da ingestão de plantas (psoralenos) e exposição à luz do sol. Entretanto, a técnica de Terapia Fotodinâmica (TFD) começou a ser empregada com sistemática científica somente bem recentemente.

Na realidade a TFD é uma modalidade médica que utiliza a combinação de luz visível e composto fotossensível na presença de oxigênio. Sua maior aplicação é no tratamento de câncer, entretanto, a técnica está sendo difundida no tratamento de outras áreas como: tratamento de outras doenças, desinfecção de materiais e superfícies e no meio ambiente. (LEVY, 1995; MACHADO, 2000; STERNBERG e DOLPHIN, 1996; STERNBERG *et al.*, 1998).

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) é uma modalidade de fototerapia onde três fatores atuam concomitantemente. O fotossensibilizador (FS), uma fonte de luz e o oxigênio. Isoladamente, nem a droga (FS) nem a luz tem a capacidade de produzir o efeito deletério ao sistema biológico testado (MELLO, 2000).

A TFDA inicia-se com a administração do fotossensibilizador, após alguns minutos para que o fármaco de acumulação do fármaco na célula, esta é irradiada.

O composto fotossensível, excitado pela luz, transfere energia e/ou elétrons para o oxigênio, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) que são citotóxicas. Tais espécies geram um estresse oxidativo local ocasionando a morte do tecido afetado (PELOI, 2007).

O termo Terapia Fotodinâmica é mais utilizado quando em aplicação humana, como na área odontológica e médica. Já na área ambiental o termo mais utilizado é Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana (IFDA), entretanto ambos os termos apresentam o mesmo conceito.

Uma estreita relação entre absorção do corante e comprimento de onda utilizado deve ser observada na utilização da terapia fotodinâmica, pois a ação fotoquímica só ocorre quando uma série de parâmetros é estabelecida. A banda de absorção do fotossensibilizador deve ser ressonante com a radiação emitida, absorvendo bem o comprimento de onda emitido (CHAN e LAI, 2003).

Na presença de oxigênio encontrado nas células, o fotossensibilizador ativado 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 (LAMBRECHTS *et al.*, 2005; DEMIDOVA e HAMBLIM, 2005) (Figura 2).

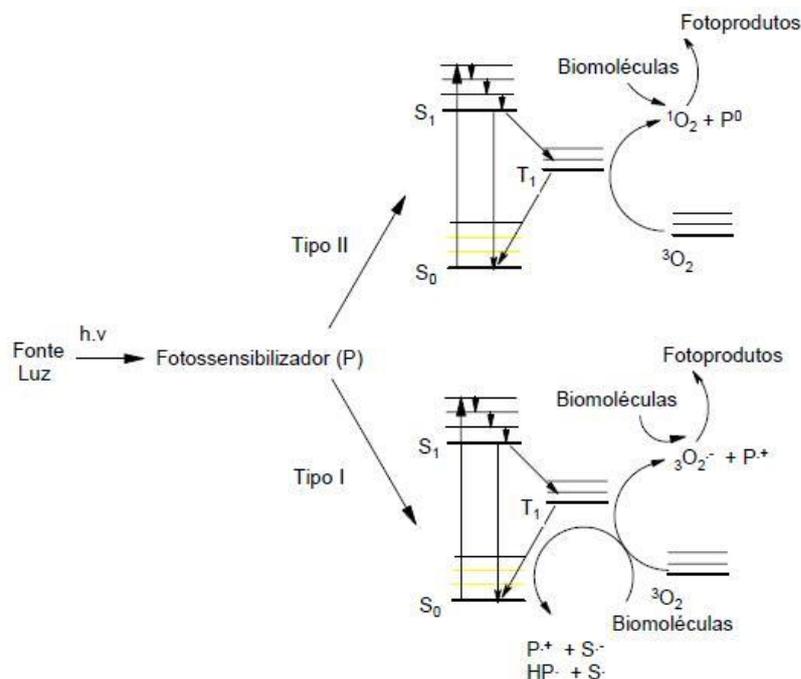


Figura 2 – Reações (Tipo I e II) de geração de EROs pela combinação de luz, fotossensibilizador e oxigênio no estado fundamental (RIBEIRO *et al.*, 2007).

No diagrama de Jablonski (Figura 3) estão representados os processos fotofísicos pertinentes a TFD.

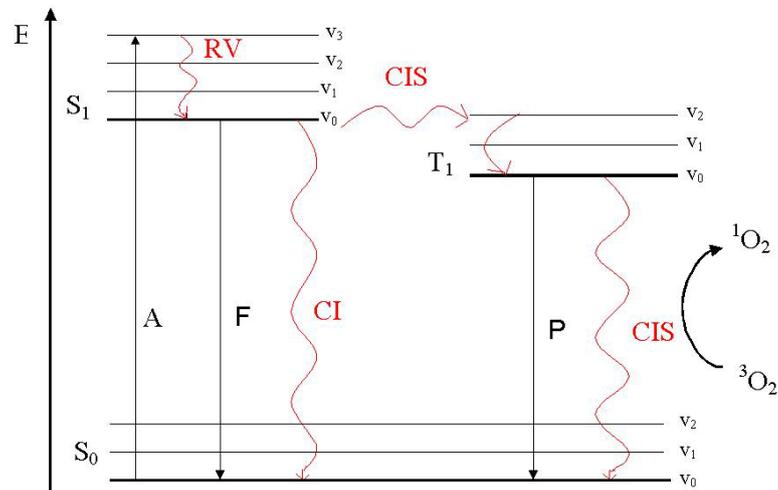


Figura 3 – Diagrama de Jablonski (PELOI, 2007).

De acordo com PELOI (2007), após a iluminação do FS no estado fundamental (S₀) é excitado para o seu estado singlete excitado (S₁). Este estado excitado tem um tempo de vida curto para interagir efetivamente com as moléculas vizinhas (na ordem de nanosegundos), normalmente perdendo energia rapidamente através de processos radiativos (emissão de fluorescência, F), e/ou não radiativos (conversão interna, CI ou cruzamento intersistemas, CIS). Para a TFD, o mais importante destes processos é o cruzamento intersistemas, caracterizado por uma inversão de spin eletrônico, levando o fármaco ao seu estado triplete excitado (T₁). A partir do estado triplete, o fármaco pode retornar para o estado fundamental pelo processo de conversão interna ou pelo processo de emissão de fosforescência (P). Deste estado excitado (T₁) os processos fotoquímicos que o FS pode sofrer são extremamente importantes.

O estado triplete excitado tem um tempo de vida da ordem de microsegundos (μs), que é longo o suficiente para permitir a interação do fármaco no estado excitado com moléculas vizinhas. Neste estado excitado, pode por transferência de elétrons com substratos orgânicos (A) produzir um substrato oxidado (A[•]) e o fármaco reduzido (T₁^{+•}) que reage com o oxigênio molecular (³O₂) gerando uma mistura complexa de espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como o

ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os quais são capazes de induzir irreparáveis danos oxidativos às células (MACHADO, 2000).

4.3 Fotossensibilizadores (FS)

A utilização de fotossensibilizantes, seguida da irradiação de luz de amplo espectro, apresenta-se como um método simples e eficaz. Algumas novas drogas (fotossensibilizadores) sintéticas fotossensibilizantes de segunda geração foram desenvolvidas (derivados de benzoporfirinas, fitalocianinas, clorinas e porfírenos) (CALZAVARA *et al.*, 2007).

Entre as características ideais de um fotossensibilizante estão à pureza química, a capacidade de localização específica em tecido neoplásico, o intervalo pequeno entre a administração da droga e o acúmulo máximo na célula, a meia-vida curta, a eliminação rápida do tecido normal, a ativação por comprimentos de onda com ótima penetração no tecido alvo e a capacidade de produzir grande quantidade de produtos citotóxicos (KALKA *et al.*, 2000).

Outra característica importante de um bom fotossensibilizador é que o mesmo não sofra fotodegradação durante o tratamento clínico. O processo denominado fotobranqueamento corresponde a reações químicas induzidas pela luz, onde as moléculas são transformadas em outros compostos, e podem ocorrer *in vitro* ou *in vivo*, nos fluidos celulares, células e tecidos. A ocorrência desse processo resulta na diminuição de absorção e intensidade de fluorescência do fotossensibilizador. O fotobranqueamento mais comum em TFDA ocorre por processo de foto-oxidação (MENEZES, 2006).

O verde malaquita (VM) é um corante usado como rotina na clínica odontológica e apresenta a característica de interagir com várias substâncias orgânicas, principalmente com o biofilme oral aderido aos elementos dentais (SOCRANSKY, 1997).

Este corante apresenta uma banda de absorção na região vermelha do espectro eletromagnético. Sua molécula é catiônica e pertence à família dos trifenilmetanos com três anéis benzênicos, conforme ilustrado na Figura 4 (GOLDING *et al.*, 1998).

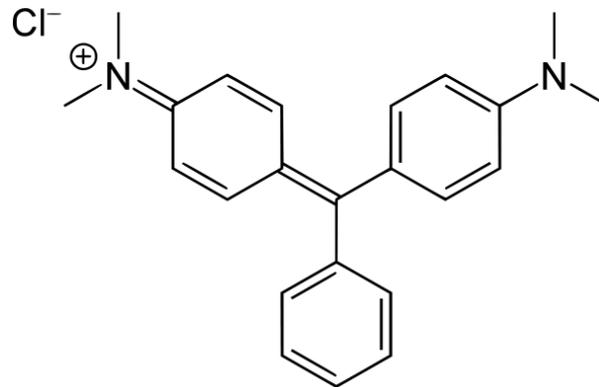


Figura 4 – Representação da estrutura química da molécula do Verde Malaquita. Disponível em 18 de dez de 2012 (<http://www.jornallivre.com.br/122914/composto-quimico-verde-malaquita.html>)

O azul de metileno (AM), Figura 5, é uma molécula que tem desempenhado importante papel em microbiologia e farmacologia. É muito conhecido como corante histológico e usado há muitos anos. Pertence à classe dos compostos benzofenotiazínicos, é amplamente usado clinicamente em organismos vivos para o tratamento da metahemoglobinemia. Dentre as pesquisas sobre o seu uso inclui-se a malária e a esquizofrenia, sendo que já em 1891 Ehrlich empregou o AM com sucesso no tratamento da malária (WAINWRIGHT, 2005).

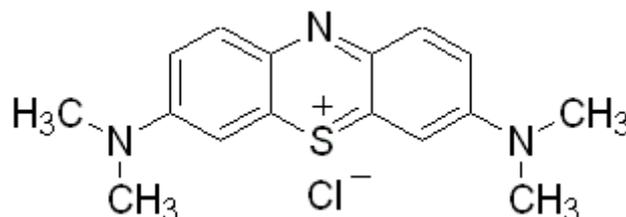


Figura 5 – Representação da estrutura química da molécula do Azul de Metileno. Disponível em 18 de dez de 2012 (<http://quimicaemdiscussao.blogspot.com.br/2012/05/aula-pratica-de-quimica-3-ano.html>).

Os corantes fenotiazínicos exibem intensa absorção de 600-660nm, região do espectro útil em TFD por estar na “janela terapêutica” requerida para a eficiente penetração da luz nos tecidos (WAINWRIGHT, 1999).

O AM, além de barato e absorver na região de luz vermelha, produz espécies reativas de oxigênio, tais como o ânion superóxido e oxigênio singleto. (ZHANG e TANG, 2004; FERNANDEZ *et al.*, 1997).

Os princípios fotoquímicos do AM encontram-se na Figura 6. O AM é ativado ao estado singleto excitado ($^1AM^*$) pela luz. Neste estado, com igual probabilidade, ele pode retornar ao estado singleto ou ir para o estado tripleto. No estado tripleto o AM pode reagir com o O_2 e formar o oxigênio singleto (1O_2) e voltar ao seu estado normal, ou em um processo muito mais lento formar superóxido. Alternativamente o AM pode reagir com substratos gerando espécies reativas de oxigênio (Floyd *et al.*, 2004).

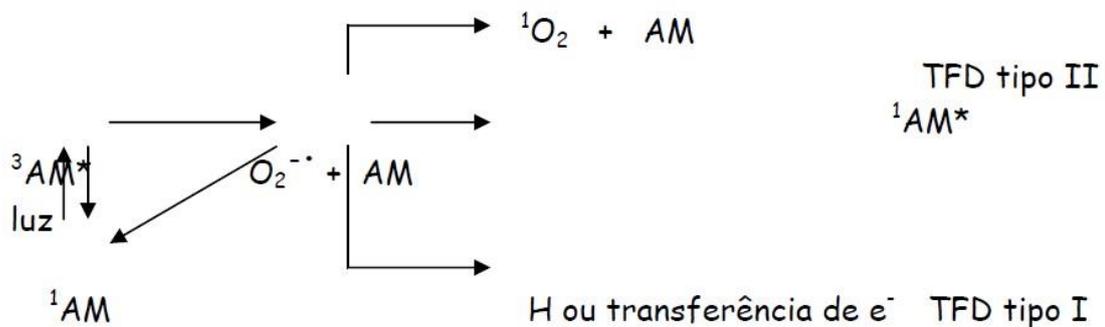


Figura 6 – Esquema da fotoquímica do azul de metileno (PELOI, 2007).

4.4 Fonte de Radiação

Diversas fontes de luz podem ser usadas na TFDA tópica. A maioria dos estudos clínicos é realizada com luz de comprimentos entre 625 e 633 nm, que permitem maior penetração na pele (KALKA *et al.*, 2000).

Quanto à fonte mais adequada para a radiação, tem sido descrito como sendo a que por um baixo custo forneça a maior quantidade de luz possível no máximo de absorção do sintetizador, sem efeitos térmicos significantes. Lasers de diodo de baixa potência como os de He-Ne requerem uma tecnologia menos complexa além de se apresentarem mais compactos (CAVALHEIRO, 2007).

O LED (Diodo Emissor de Luz) é uma categoria de fonte de luz fria que emite radiação numa faixa mais ampla do espectro, porém, com um comprimento de onda predominante, apresenta emissão de luz não-coerente e com certo espalhamento. Por apresentar um custo mais baixo e uma tecnologia mais simples,

comparado ao laser, tem-se apresentado como um facilitador para a adesão à TFDA (SILVA *et al.*, 2007; BONACIN *et al.*, 2009).

Para o uso em Terapia Fotodinâmica (TFD) os LEDs oferecem vantagens quanto ao custo e a área que podem irradiar. Podem apresentar potência semelhante aos lasers de baixa intensidade na banda do vermelho visível. A junção de vários LEDs permite supor que o sistema pode ser empregado, com maior potência luminosa, melhorando a eficiência dos tratamentos e, portanto, trazendo novas possibilidades do uso da TFD (GOMES, 2003).

Recentemente, os LEDs (Light Emitting Diode) surgiram como fonte de radiação alternativa com vantagens relacionadas ao custo (MEISEL e KOCHER, 2005). Outro fator importante a ser considerado o grande número de tipos de LED disponíveis no mercado.

Em comparação com os lasers, os diodos emissores de luz não apresentam boa colimação e coerência resultando em bandas de emissão mais largas o que favorece a ação dos fotossensibilizadores. A possibilidade do emprego da junção de vários LEDs permite a ação da radiação sobre uma superfície maior, aumentando a aplicabilidade da Terapia Fotodinâmica.

5. METODOLOGIA

5.1 Equipamentos, Materiais e Reagentes

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR (Campus Curitiba), com a interação do Departamento Acadêmico de Química e Biologia – DAQBI e do Departamento Acadêmico de Física - DAFIS, disponibilizando os recursos já existentes e necessários para realização dos ensaios.

Foram utilizados os seguintes materiais, reagentes e equipamentos:

Cepa Liofilizada de *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Lâmpadas de LEDs, suporte de universal e bocal E27.

Medidor digital de luz (EXTECH Instruments, modelo 403125).

Balança Semi Analítica (PRECISION, modelo PR1000NW).

pH-metro MICREAL B474.

Estufa REQUIPEL 37°C.

Autoclave Vertical (PHOENIX LUFERCO, modelo Av-75).

Contador de Placas PHOENIX, contador mecânico CP 602.

Alça de níquel-cromo.

Alça de Drigalsky.

Tubos de ensaio.

Placas de Petri.

Micropipetas.

Béquer.

Caldo Nutriente BIOBRAS.

Ágar Contagem de Placas (PCA) HIMEDIA LABORATORIES PVT.

Brain Heart Infusion Broth (Caldo BHI) ACUMEDIA MANUFACTURES, INC. LASING MICHIGAN 48912.

Cloreto de Sódio, P.A. Cristalizado Reagente Analítico A.C.S. HUMIBRÁS Indústrias Químicas S.A.

Azul de metileno (VETEC, 05/09) e Verde malaquita (VETEC, 11/08).

5.2 Ativação da Cepa

Foram adquiridas cepas liofilizadas da bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922. Para ativação da cepa foi inoculado, com pinça estéril, um disco da cepa padrão em tubo de ensaio 10 ml contendo meio líquido BHI (“Brain Heart Infusion”), e estocado em estufa por 24 horas a 37,5°C. Após crescimento, foram procedidas inoculações durante três dias, sempre utilizando o conteúdo do tubo do dia anterior em um novo tubo com BHI, mantidos sob as mesmas condições iniciais (MÜLLER, 2006).

Atingida a etapa de crescimento máximo bacteriano, foi realizado o método de esgotamento o com conteúdo do último tubo, em placas de Petri com meio PCA (“Plate Counter Agar”), e incubadas por 24 horas a 37,5°C.

Foram estocados em geladeira seis tubos de rosca de 5 ml, todos cultivados por 24 horas a 37,5°C em estufa, sendo três para banco de cepas (cepas padrão) e três empregados para os estudos (estoque), dos quais eram feitos repiques.

Para cada conjunto de experimentos uma UFC (unidade formadora de colônia) foi retirada do estoque e inoculada em tubos de ensaio contendo 10 ml de caldo simples e incubadas a 37,5 °C por 24h.

Após preparo da amostra da cepa era realizado procedimento para escolher diluição que proporcionasse um número entre 30 e 300 UFC (Figura 7).

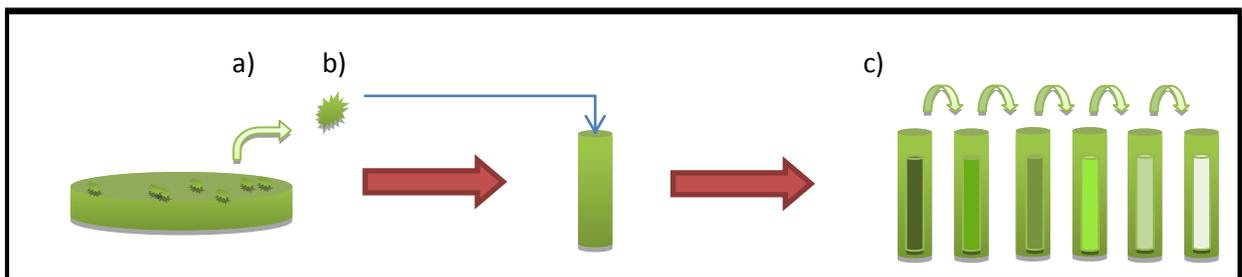


Figura 7. Fluxograma da diluição da cepa. a) Cepa estoque. b) Inoculação em caldo BHI – incubado 24h/37°C. c) Preparo de diluições em solução salina (Fonte: o autor).

5.3 Padronização do Inóculo

Foram utilizadas duas metodologias clássicas para a padronização microbiana, a escala nefelométrica de Mc Farland (NCCLS, 2002) e o método turbidimétrico (DEVIIENNE, 2000).

A suspensão bacteriana foi previamente padronizada adicionando-se uma cultura de 24h, em um tubo contendo solução salina estéril até atingir uma turbidez igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml). A seguir foi realizada a leitura espectrofotométrica ($\lambda=625$ nm) medindo a absorbância correspondente à suspensão.

Posteriormente, as amostras foram diluídas até diluição 10^{-6} e então plaqueadas para contagem de UFC, configurando assim o princípio de todos os testes microbiológicos.

As práticas adotadas como: tempo de *overnight* de 24h, horário de manipulação (noturno, diurno,...), dentre outros fatores, foram seguidos e repetidos rigorosamente, sendo que várias vezes todos estes procedimentos foram realizados (seguidos de inoculação e contagem em placa), sempre em triplicatas ou quadruplicatas.

5.3.1 Escala de McFarland e Método Turbidimétrico

A primeira etapa da padronização consistiu no preparo da escala padrão de McFarland, que corresponde a uma suspensão de BaSO_4 obtida a partir da mistura de soluções de BaCl_2 e H_2SO_4 . A escala de McFarland apresenta uma série de valores de turbidez, que variam entre 0,5 a 10 e que equivalem ao volume (em mililitros) de uma solução de BaCl_2 0,048 mol/L – correspondente a 1,175% (p/v) do sal na forma de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – à qual se adiciona uma solução de H_2SO_4 1% (v/v), em quantidade suficiente para 100 mL (FERRONATO e SALMASO, 2010).

Nos testes de atividade antimicrobiana, o padrão utilizado correspondeu ao valor 0,5 da escala de McFarland, ou seja, 0,5 mL da solução de BaCl_2 0,048 mol/L e 99,5 mL da solução de H_2SO_4 1% (v/v). A turbidez resultante equivale à de uma suspensão contendo aproximadamente 1 a 2×10^8 células/ml de *Escherichia coli* ATCC 25922 (NCCLS, 2003).

Para assegurar a qualidade no preparo do padrão, foi realizada uma leitura em espectrofotômetro (Femto/482) a 625 nm, sendo que a densidade óptica resultante deve estar entre 0,08 a 0,10. Essa leitura foi repetida a cada mês, para verificação da necessidade de substituição do padrão. É importante realizar uma boa homogeneização com um agitador do tipo vórtex, sempre que a suspensão for

utilizada. O armazenamento foi realizado em recipiente hermeticamente fechado, em local escuro e à temperatura ambiente (NCCLS, 2003).

O princípio para preparo do inóculo bacteriano é igualar a densidade óptica de uma suspensão de células à da suspensão padrão de McFarland, o que pode ser realizado de duas maneiras: visualmente ou com auxílio do espectrofotômetro. O uso do espectrofotômetro, apesar de garantir resultados mais precisos e estar descrito em protocolos oficiais, tem como desvantagem a possibilidade de contaminação, pela dificuldade de manutenção de um ambiente estéril. Sugere-se, portanto, a comparação visual, que deve ser realizada sob iluminação ambiente adequada e com um cartão branco com linhas contrastantes pretas, ao fundo (Figura 8). É importante utilizar tubos de ensaio de mesmo diâmetro para a comparação visual entre a suspensão padrão e o inóculo (NCCLS, 2003).

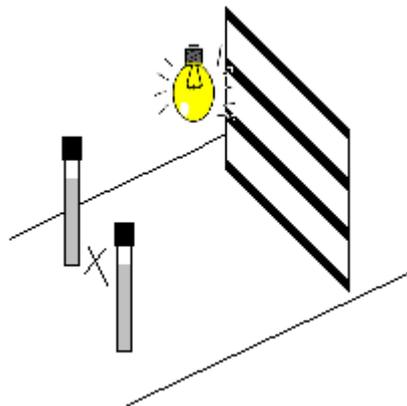


Figura 8 – Comparação visual – Escala Mc Farland
(FERRONATO e SALMASO, 2010).

Segundo a norma M7A6 (NCCLS, 2003) o método de diluição em caldo é utilizado para avaliar quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano. Segundo ELOFF (1998) a técnica alternativa mais amplamente utilizada em ensaios microbiológicos é a de diluição seriada de extratos em tubos seguidos da adição do microrganismo, usando turbidez como um indicador do crescimento.

Para realizar os testes turbidimétricos foram realizadas diluições sucessivas da suspensão bacteriana (que estava incubada por 24h a 37°C), em solução salina obtendo as diluições de 10^{-1} a 10^{-6} vezes a amostra inicial. Com essas diluições foram realizadas as leituras de absorbância no espectrofotômetro, utilizando como

controle uma solução salina estéril, seguidas de contagem em placa de petri para quantificação das UFCs.

Com os resultados foi construída uma reta correlacionando UFC com absorbância, a fim de padronizar o inóculo referente à determinada leitura em espectro.

5.4 Sistema de Radiação

A lâmpada de LEDs (Marca: FLC com 18 LEDs; Corrente nominal 127 V; Dimensões – diâmetro x comprimento – 63 mm x 78 mm; Potência máxima: 3 watts. Comprimento de onda: 600 – 660 nm), com o auxílio do bocal com entrada E27, foi fixada no suporte universal, formando o sistema de irradiação (Figuras 9 e 10).



Figura 9 – Foto da Lâmpada de LED utilizada (Fonte: o autor)



Figura 10 – Foto do bocal E27 fixado no suporte universal – sistema de irradiação (Fonte: o autor)

Com o luxímetro (EXTECH Instruments, modelo 403125), foram realizadas as medições da iluminância, em lux, que chega a superfície líquida presente no béquer, emitidas pela lâmpada de LEDs a uma distância de 3 cm. A fim de verificar se a intensidade luminosa da lâmpada atingia a superfície líquida de forma homogênea, as medições foram feitas em 5 pontos distintos, conforme esquematizado na Figura 11.

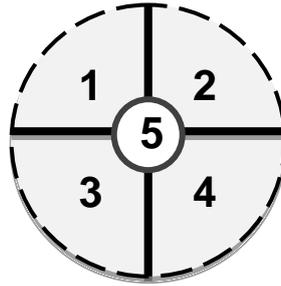


Figura 11 – Esquema segmentado para medição de luz. (Fonte: o autor)

A Tabela 1 mostra os parâmetros que foram empregados durante os testes da IFDA que utilizaram o sistema de radiação, sendo que os valores de densidade de energia foram calculados frente aos tempos de exposição (5, 10 e 15 minutos), sendo os valores máximos possíveis obtidos com a lâmpada em questão.

Tabela 1 – Parâmetros empregados durante os períodos de radiação da suspensão bacteriana.

Potência (mW)	Diâmetro (cm)	Área de Radiação (cm ²)	Área Irradiada (cm ²)	Tempo (min)	Densidade de Energia (J/cm ²)
3000	3,2	31,15	8,04	5	111,9
				10	223,9
				15	335,8

5.5 Teste de Inibição Microbiana

O objetivo do teste de inibição microbiana foi encontrar a melhor concentração para realização dos testes da IFDA, a qual deve apresentar baixos níveis de toxicidade local na ausência de irradiação e baixa incidência de toxicidade quando administrado sistemicamente (MÜLLER, 2006).

Para determinar a inibição dos corantes (na ausência da luz), à suspensão de bactéria, com diluição prévia do microrganismo em 10^{-6} UFC, foi adicionado corante (azul de metileno e verde malaquita) em diversas concentrações.

A concentração de corante adicionada à suspensão era agitada e deixada por 10 min em contato. Seguindo-se com a retirada e inoculação através do plaqueamento de 0,1 ml de cada amostra em placas de petri.

O procedimento era realizado em triplicata ou quadruplicata, sendo que para o controle era adicionada água deionizada estéril para substituir o volume de corante.

Todos os materiais que envolviam procedimentos com microrganismos foram devidamente autoclavados ou esterilizados por desinfecção química antes e depois da utilização.

5.6 Testes da Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana

Para cada conjunto de testes era coletada uma UFC de uma das placas armazenadas. A UFC coletada foi inoculada em tubo de ensaio contendo 10 ml de caldo simples e em seguida, o tubo era colocado em estufa a 37°C por 24h. Após esse período foi realizado a diluição da amostra, em solução salina, até 10^{-6} vezes.

Os experimentos eram conduzidos sendo preparados tubos de ensaio com tampa contendo: solução bacteriana, fotossensibilizador e água, conforme as necessidades, finalizando sempre um volume de 10 ml (9 ml de suspensão bacteriana + 1 ml de FS ou água deionizada no controle).

Os tubos foram tampados, agitados em vortex e deixados em repouso por 10 minutos (isentos de luz). Em seguida, eram colocados em béqueres para realização dos testes efetivos. Foram separados em grupos: controle (bactéria + água deionizada), inibição (bactéria + FS), somente radiação (bactéria + radiação) que foi irradiado 15 minutos e IFDA (bactéria + FS + radiação), onde variou o tempo da irradiação – 5, 10 e 15 minutos (Figura 12).

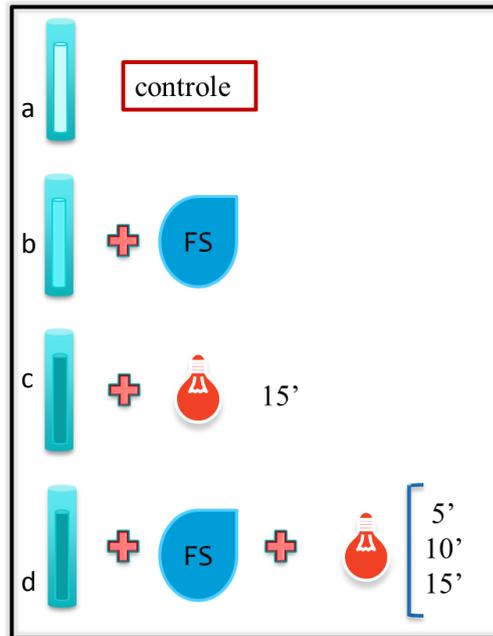


Figura 12 – Esquema da construção do teste da IFDA: a) controle (bactéria). b) inibição (bactéria + FS). c) radiação (bactéria + 15 radiação). d) IFDA (bactéria + FS + 5/10/15 radiação).

Após o processo era retirada alíquota de 0,1 ml da solução de cada béquer sendo estas, inoculadas em placas de petri, envoltas em papel kraft e incubadas por 24 h, em estufa a 37°C. Então o número de unidades formadoras de colônia era contado (Figura 13), e a partir dessa contagem, realizaram-se os cálculos.

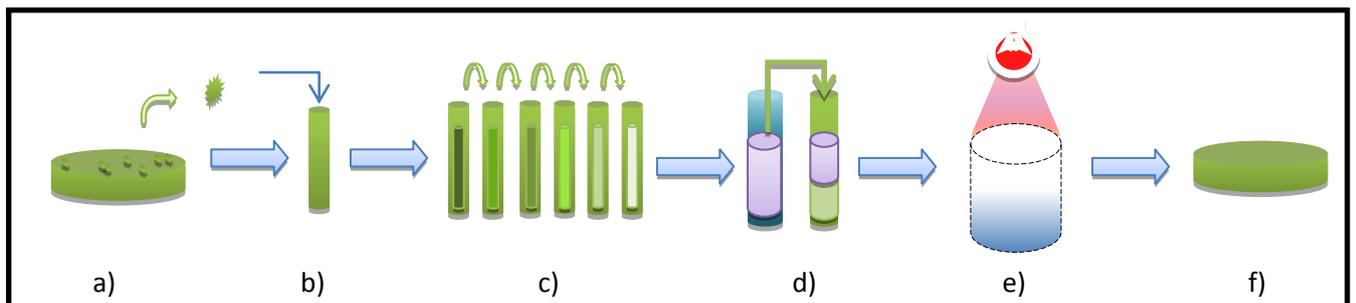


Figura 13 – Fluxograma dos procedimentos de preparo de cepa para os testes efetivos da IFDA. a) Cepa estoque. b) Inoculação em caldo BHI – incubado 24h/37°C. c) Preparo de diluições em solução salina – de 10^{-1} a 10^{-6} vezes a amostra de origem. d) Preparo das amostras. e) Irradiação. f) Incubação em estufa para contagem de UFCs.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Padronização do Inóculo

Inicialmente, foi realizado o trabalho frente à padronização microbiana. Os métodos empregados na tentativa de padronizar o inóculo, a escala de McFarland e o método turbidimétrico, não apresentaram boa aplicabilidade. Isto porque a subjetividade que cada pessoa possui em comparar a olho nu a amostra e a escala de Mc Farland gera um erro de padronização muito grande, e uma vez que ao realizar uma confirmação com o auxílio de espectrômetros aumenta muito a chance de contaminação, a metodologia de padronização pela escala de Mc Farland foi descartada.

Segundo a norma M7A6, a técnica de turbidimetria requer grande quantidade de extratos não sendo útil em bioensaios para compostos antimicrobianos, o que foi comprovado ao ponto que ao realizar as leituras de absorbância da amostra contendo inóculo as maiores concentrações obtiveram sucesso na leitura, já as menores concentrações, devido à baixa concentração do inóculo, obteve-se leituras errôneas ou o espectro não conseguiu realizá-las.

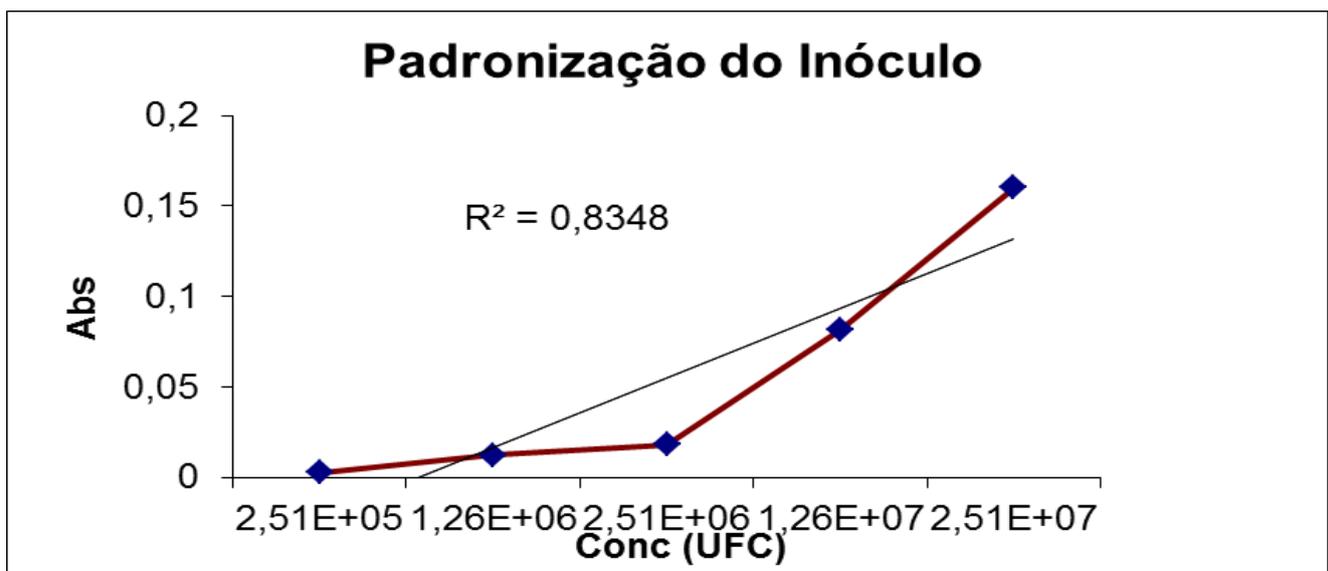


Figura 14 – Curva de Padronização do Inóculo: Absorbância x Concentração

Já que somente as amostras que continham maiores concentrações foram passíveis de realizar leitura, o princípio pretendido foi partir das concentrações

maiores e realizar uma correlação, entre concentração (número de UFC) e absorvância, com um extrapolemanto da reta construída, podendo assim chegar a uma condição padrão referente à quantidade de bactérias para iniciar os testes. Entretanto, ao realizar testes confirmatórios desse princípio constatou-se que há uma incoerência em sua aplicabilidade, não podendo ser adotada a condição de extrapolemanto da reta, uma vez que os valores de UFC obtidos não corroboraram com os valores previstos. Partindo deste motivo, a metodologia por turbidimetria para padronizar o microrganismo também foi rejeitada.

Então, após verificar que os procedimentos adotados nos experimentos como: tempo de incubação em estufa de 24h, cautela na manipulação das micropipetas, diluição muito bem homogeneizada (com auxílio do agitador de tubos tipo vortex) e executada, seguida de inoculação em placa, os quais numa série de repetições demonstraram uma reprodutibilidade e uma padronização experimental muito interessante, obtendo contagens muito próximas e válidas.

Por relacionar todas as interpretações referentes aos testes com o controle microbiano, obtendo uma correlação em cada teste, onde a estimativa microbiana na amostra é apontada ao realizar a contagem do controle, optou-se pela padronização da rotina experimental.

6.2 Sistema de Radiação

Como variação para os sistemas de radiação apresentados e aplicados (LAMBRECHTS, 2005; PASCHOAL, 2009; WAINWRIGHT, 1998), tem-se a iluminância, respectiva para cada ensaio fotoquímico, a qual interage com a amostra em estudo (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de iluminância referente à radiação emitida pela lâmpada.

Ponto	Iluminância (lx)
1	6230
2	6080
3	6880
4	7430
5	17060

Os valores associados aos pontos periféricos (1 a 4) são diferenciais do ponto central (5), pois estão baseados nas leis de Lambert onde “o iluminamento varia inversamente com o quadrado da distância do ponto iluminado ao foco luminoso” (MULLER, 2006), conforme equação (1).

$$E = \frac{I(\theta) \cos \theta}{d^2} \quad (1)$$

Onde:

E: iluminamento em lux (lx)

I: intensidade luminosa em candelas (cd)

Teta (θ): ângulo entre a vertical à superfície receptora e o ponto a ser iluminado

d: distância do foco luminoso ao ponto em metros (m)

Portanto, o feixe de radiação nas bordas do béquer mostrou-se numa intensidade menor do que o feixe central, ao ponto que nas bordas o valor médio é $6655 \text{ lx} \pm 311$ e no centro o valor é 17060 lx .

Muito se dá pela forma da lâmpada, sendo que o formato côncavo faz jus aos resultados, onde o centro da lâmpada emite uma radiação mais intensa, mesmo porque o feixe de luz em ângulo 0° possui a maior intensidade que a lâmpada pode emitir, uma vez que a fórmula para seu cálculo está baseada no cosseno do ângulo em questão.

6.3 Teste de Inibição Microbiana

Não há um consenso em relação aos parâmetros empregados envolvendo a terapia fotodinâmica em microrganismos, incluindo a concentração dos corantes (PASCHOAL, 2009). O FS pode não ser efetivo contra bactérias até que certa concentração inicial tenha sido determinada (MULLER, 2006). Isto é, necessita-se garantir que de fato o corante conseguiu adentrar a parede e a membrana celular. Se as reações, envolvendo a formação de oxigênio singlete ocorrer fora da célula, não poderão afetar a mesma e ocasionar a sua morte (WAINWRIGHT, 1998).

A diferença morfológica entre bactérias Gram+ e Gram- é que estas últimas possuem uma membrana externa (bicamada lipídica) fora da camada de peptídeoglicano (MALIK *et al.*, 1992), fator que influencia na entrada do FS na célula e conseqüentemente na efetividade da interação do FS com a bactéria.

O teste de inibição realizado variando as concentrações dos fotossensibilizadores apresentaram os resultados de inibição expressos nas Tabelas 3 e 4, calculados de acordo com o controle deste ensaio. Os valores referentes à inibição adotados neste trabalho foram de 20 a 30%.

Para os testes envolvendo o Azul de Metileno foram testadas as concentrações de 50000, 10000, 1000, 100 e 10 $\mu\text{Mol/L}$.

Tabela 3 – Relação entre concentração de AM e taxa de inibição, frente a *E.coli*.

AM ($\mu\text{Mol/L}$)	<i>E.coli</i>	Média (UFC)	Coef Variação	Desvio Padrão	Inibição em (%)
50000	9×10^{-7}	144	0,10	14,98	45,5 \pm 9
10000	9×10^{-7}	174	0,05	9,29	34,4 \pm 5
1000	9×10^{-7}	203	0,06	11,79	23,3 \pm 7
100	9×10^{-7}	241	0,05	11,50	8,8 \pm 7
10	9×10^{-7}	235	0,06	15,18	11,3 \pm 9

A concentração mais adequada obtida experimentalmente foi 1000 $\mu\text{Mol/L}$ para o AM. Ao considerar os valores de inibição do AM com seus respectivos erros padrões, as concentrações 10 e 100 $\mu\text{Mol/L}$ foram descartadas por serem estatisticamente baixos (8,8% \pm 7 e 11,3% \pm 9, respectivamente), enquanto a concentração utilizada possui um valor aceitável que corresponde a uma inibição de 23,3% \pm 7.

O resultado referente ao AM não corrobora com as afirmações de outros autores (WAINWRIGHT, 1998; WAINWRIGHT *et al.*, 1997; PELOI, 2007; JONES *et al.*, 1996) entretanto, o sistema de planejamento, desenvolvimento e execução experimental utilizado por eles foi diferente, sendo por outro tipo de radiação (Laser, Exal Light Box), por outra forma de irradiação, por ser feito em outros locais (placa, micropoços), ou até mesmo pelo volume do sistema ser diferente.

Para os testes envolvendo o Verde Malaquita foram testadas as concentrações de 1000, 750, 500, 250 e 100 $\mu\text{Mol/L}$.

Tabela 4 – Relação entre concentração de VM e taxa de inibição, frente a *E.coli*.

VM ($\mu\text{Mol/L}$)	<i>E.coli</i>	Média (UFC)	Coef Variação	Desvio Padrão	Inibição em (%)
1000	9×10^{-7}	14	0,40	5,51	$92,2 \pm 3$
750	9×10^{-7}	29	0,33	9,54	$83,4 \pm 6$
500	9×10^{-7}	51	0,30	15,13	$70,9 \pm 9$
250	9×10^{-7}	84	0,13	11,14	$52,0 \pm 6$
100	9×10^{-7}	130	0,08	10,54	$25,7 \pm 6$

A concentração mais adequada obtida experimentalmente para o VM foi $100\mu\text{Mol/L}$, visando que foi a menor concentração testada onde pode se observar uma interação da bactéria com o fotossensibilizador, correspondendo a uma inibição de $25,7 \pm 6$.

O resultado referente ao VM além de estar de acordo com o esperado, se mostrou abaixo dos resultados da literatura (PRATES, 2005).

Os valores de inibição para ambos FS estão dentro dos padrões estabelecidos para o presente trabalho. Com estas concentrações foram realizados os experimentos da IFDA.

6.4 Teste da Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana

Foram realizadas várias baterias de testes com a concentração mais adequada de cada corante (AM e VM), todos associados aos tempos de 5, 10 e 15 minutos de irradiação. As amostras que compõem os grupos de teste efetivos da IFDA são: o controle positivo, a luz (somente a radiação), a inibição (teste refeito a cada bateria de testes) e os testes com FS expostos a 5, 10 e 15 minutos de radiação.

A Tabela 5 mostra os resultados referentes à IFDA utilizando como FS o AM em concentração $1000\mu\text{Mol/L}$. A partir dos valores adquiridos foram realizados os cálculos de porcentagem de inibição referentes ao controle bacteriano.

Tabela 5 – Caracterização dos testes da IFDA com a utilização do AM como FS na concentração de 1000µMol/L

IFDA	Média em UFC	Coef Variação	Desvio Padrão	Inibição em (%)
Controle	129	0,06	7,21	-
Luz	126	0,19	23,39	2,3 ± 14
Inibição	80	0,20	15,72	38,0 ± 9
FS+Luz+5min	57	0,19	11,02	56,1 ± 6
FS+Luz+10min	19	0,30	5,77	85,0 ± 3
FS+Luz+15 min	7	0,38	2,65	94,6 ± 2

Pode-se observar uma redução muito significativa dos grupos que foram irradiados e continham o FS. Apesar de não ter sido suficiente para provocar a morte total dentro do tempo máximo utilizado (15 minutos), a inibição foi amplamente satisfatória, comparada com outros tempos (de 30 a 60 minutos) empregados em outros trabalhos (ROSA, 2011; PELOI, 2007), ou para outros sistemas de irradiação (JONES *et al.*, 1996).

No teste com somente a radiação, não houve inibição significativa, sendo assim, a fonte de radiação por si só não representou uma fonte de inibição microbiana.

Assim como nos testes de inibição do azul de metileno, o ensaio envolvendo somente a bactéria e o FS apresentou certa inibição que não foi tóxica o suficiente para inibir todo o crescimento microbiano, caracterizando assim apenas uma interação do FS com a bactéria.

A cepa de *E. coli* submetida aos testes com azul de metileno, associado aos tempo de irradiação de 5, 10 e 15 minutos ao sistema de LEDs vermelho, apresentaram inibição satisfatória e ficou dentro dos padrões esperados da IFDA.

A Tabela 6 apresenta os resultados relacionados à IFDA utilizando como FS o VM em concentração 100µMol/L. A partir dos valores adquiridos foram realizados os cálculos de porcentagem de inibição referentes ao controle bacteriano.

Tabela 6 – Caracterização dos testes da IFDA com a utilização do VM como FS na concentração de 100µMol/L

IFDA	Média em UFC	Coef Variação	Desvio Padrão	Inibição em (%)
Controle	172	0,08	13,61	-
Luz	150	0,07	10,15	12,6 ± 6
Inibição	121	0,10	12,01	29,7 ± 7
FS+Luz+5min	83	0,10	8,39	51,8 ± 5
FS+Luz+10min	70	0,04	2,52	59,0 ± 1
FS+Luz+15 min	69	0,05	3,51	60,0 ± 2

Ao realizar os experimentos com a concentração de 100µMol/L adquirida experimentalmente, foi possível observar um resultado não tão satisfatório como o do AM, com os valores referentes a inibição bacteriana de 5 a 15 minutos de exposição a radiação permaneceram numa faixa de inibição muito baixa (de 50 a 60%). Uma grande parte das bactérias, neste caso, permaneceu isenta da inibição fotodinâmica conseguindo continuar sua reprodução normalmente, fato que invalidou a concentração testada.

Sendo assim, foi proposta a realização de novos testes, porém desta vez, com outra concentração de VM (250µMol/L), a qual se aproxima da concentração estipulada pela literatura, obtendo-se os resultados expostos na Tabela 7.

Tabela 7 – Caracterização dos testes da IFDA com a utilização do VM como FS na concentração de 250µMol/L

IFDA	Média em UFC	Coef Variação	Desvio Padrão	Inibição em (%)
Controle	142	0,05	7,50	-
Luz	133	0,08	11,24	6,4 ± 6
Inibição	97	0,04	4,04	30,4 ± 2
FS+Luz+5min	82	0,12	9,64	42,0 ± 6
FS+Luz+10min	62	0,09	5,29	56,3 ± 3
FS+Luz+15 min	15	0,25	3,70	89,8 ± 2

Conforme os dados obtidos, pode-se observar que com o aumento da concentração do FS em questão, mantendo as mesmas condições testadas, tanto de distância da fonte de radiação como tempo de exposição, aumentou a efetividade da IFDA e apesar de não ter atingido a marca de 100%, o teste referente a concentração de 250 μ Mol/L se mostrou eficiente após 15 minutos de irradiação inibindo 89,9% \pm 2.

No teste somente com a radiação houve pouca inibição, concluindo que esta inativação, reforçado juntamente com o teste da IFDA, mostrou que a toxicidade frente à bactéria foi menos intensa o que demonstra que houve uma interação entre a bactéria e o FS e não como uma característica inibitória.

Apesar do teste primário de inibição ter apontado à concentração de 250 μ Mol/L como inválida num primeiro momento os testes efetivos da IFDA contemplam juntamente com os demais ensaios, o ensaio da amostra frente somente a concentração de FS utilizada, configurando um novo teste de inibição. Para isso, o teste de inibição que compôs o teste da IFDA valida esta concentração, uma vez que a inibição referente (30,4 \pm 2) está dentro do padrão estabelecido no presente trabalho.

Os testes da IFDA confirmaram que o FS verde malaquita se mostrou mais tóxico que o azul de metileno, pois para atingir uma inibição de aproximadamente 90%, o verde malaquita dispôs de uma concentração quatro vezes menor que o azul de metileno. A toxicidade do VM é notificada, uma vez que ele apresenta uma restrição quanto ao uso associado ao homem quando comparado com o AM, onde segundo a ficha de segurança do fabricante de pigmentos e corantes, deve-se evitar qualquer tipo de contato (com olhos, pele, nariz,...) a fim de evitar complicações à saúde e por sua aplicação utópica possui como finalidade o tratamento de fungos em animais (HASHIMOTO, 2010), além de se classificar como produto tóxico e nocivo.

Apesar do efeito bactericida do azul de metileno observado neste ensaio implicar em utilizar o FS numa maior concentração, sua toxicidade é reportada como sendo muito baixa. Ele tem sido usado em elevadas concentrações em vários diagnósticos e terapias, incluindo injeção intrarterial em cirurgias reconstrutivas (ROBERT, 1998), administração intravenosa (5mg/kg diluído em 500 ml de solução glicosada) para tratamento de hiperparatireoidismo primário (BROWN *et al.*, 1996), em infusões contínuas para tratamento de choque séptico (ORTH *et al.*, 1995),

sendo que sua aplicação mais importante na terapia fotodinâmica é contra células neoplásicas (TEICHERT *et al.*, 2002).

Não foi possível realizar uma comparação direta entre os FS, pois as concentrações utilizadas nos testes de IFDA foram diferentes. Isto se deu devido ao teste de inibição realizado previamente, onde o VM apresentou uma inibição muito alta em relação à mesma concentração de AM. Sendo assim, o parâmetro de comparação foi o padrão adotado neste trabalho (de 20 a 30% de inibição), ou seja, a concentração que obteve a inibição de acordo com este padrão.

Mesmo existindo a toxicidade individual associada aos FS, a qual é potencializada com o auxílio da radiação, não se obteve nenhum resultado de inibição total, ou seja, 100% de morte bacteriana. A principal causa se deve ao fato de que embora não existam estudos detalhados sobre a carga iônica total carregada pelo muco extracelular, existem trabalhos que mostram a interação hidrofóbica entre o muco bacteriano em promover adesão a superfícies e assim determinar patogenicidade bacteriana (DAS *et al.*, 2001; SCHMIDT *et al.*, 1998).

Segundo Müller (2006) pode-se supor que as características do muco têm um significativo papel na determinação da ligação e penetração intracelular de FS que varia em carga e hidrofobicidade. Portanto uma menor ou maior morte bacteriana pode ser determinada pelas características de sua superfície quanto à penetração do agente fotossensibilizante e também pelas características hidrofóbicas do mesmo. A interação entre o FS e a bactéria é determinante para a efetividade da IFDA, sendo que a natureza complexa da membrana externa das bactérias gram-negativas dificulta a penetração de agentes fotossensibilizantes, e para uma melhor ação dos FS é necessário utilizar substâncias que promovam o rompimento de sua membrana externa.

A investigação do tempo da exposição à lâmpada de LEDs indica que o balanço entre a concentração do AM e do VM e o tempo da iluminação pode controlar a eficiência da IFDA (JONES *et al.*, 1996) e os resultados com a lâmpada de LED em *E.coli* são tão eficazes quanto os usando LASER (WAINWRIGHT *et al.*, 1997) ou a Exal light box (PELOI, 2007).

As dificuldades de comparação dos resultados com a literatura devem-se a ausência de parâmetros pré-definidos para utilização da IFDA, o que torna difícil uma comparação fiel dos resultados obtidos entre os diferentes trabalhos. Além disso, a concentração do FS, o tempo de incubação e o tipo de fotossensibilizador,

assim como o estado fisiológico dos microrganismos, formas de irradiação, período de exposição e densidade de energia da fonte de radiação podem igualmente influenciar os resultados de IFDA (TEICHERT *et al.* 2002).

7. CONCLUSÕES

Os resultados sugerem e confirmam que o fotossensibilizador azul de metileno tem um bom valor de atividade fotodinâmica, assim como o verde malaquita. Num processo comparativo entra o azul de metileno e o verde malaquita foi observado que ambos são úteis em induzir morte em bactérias gram-negativas sendo, portanto, eficazes como agentes fotossensibilizantes da IFDA, e que a maior concentração de AM produziu valores similares ao VM na indução de morte bacteriana. Embora ambos tenham apresentado um ótimo desempenho, o AM é mais útil para ser usado na IFDA, seja por ser de mais fácil aquisição, ou por ser utilizado tópica ou utopicamente há mais tempo no tratamento de algumas doenças, ou até mesmo por ser menos tóxico.

Os ensaios com microrganismos mostram efeitos inibitórios de crescimento e de mortandade (nas cepas de *E.coli* estudadas) na presença de AM e VM, com efeito, altamente intensificado pela aplicação de luz, demonstrando que o sistema AM/LED e VM/LED podem ser uma alternativa para o controle de bactérias. Os resultados relatados apoiam ainda mais a conclusão de que AM representa uma classe de fotossensibilizadores que são potencialmente úteis tanto na utilização destinada à área da saúde, quanto na área ambiental.

O sistema de LEDs desenvolvido foi altamente conveniente para as aplicações propostas com os corantes. A irradiação com lâmpadas de LEDs, na presença dos fotossensibilizadores produziram fotoinativação eficaz da bactéria gram-negativa aqui estudada.

O trabalho demonstrou grandes potencialidades e amplo desenvolvimento das perspectivas oferecidas para o processo de IFDA para reutilização de águas. A desinfecção fotoquímica de águas residuais utilizando AM é possível no futuro desde que solucionem os problemas que surgem a partir do uso do corante e a sua dispersão no ambiente. Utilizando os FS ligados a um suporte sólido, por exemplo, se tornaria potencialmente viável tanto para a reciclagem/ reutilização do FS, quanto para se livrar dos problemas de eliminação do corante na fase dissolvida. Assim, a viabilidade desta abordagem em escala de laboratório poderá ser considerada em futuras pesquisas, assim como a avaliação de custo quando se atinge um ponto em que ele pode ser utilizado numa escala industrial.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliação da ação fotodinâmica antimicrobiana de *Escherichia coli* utilizando concentrações inferiores de FS às citadas neste estudo;
- Avaliação da redução microbiana de bactérias gram-positivas e outras bactérias gram-negativas;
- Outros microrganismos poderiam ser contemplados, fungos, por exemplo;
- Provas bioquímicas com as colônias sobreviventes;
- Irradiação de amostras com volume maior e/ou em outros recipientes;
- Desenvolvimento de método visando à retirada dos corantes da água ou métodos que imobilizem os FS, facilitando sua remoção da água;
- Novos testes com fontes diferentes com maior potência (*LEDs*, *LASER* ou energia solar);
- Desenvolver estudo voltado para a análise física funcional da fonte de radiação, com possível análise quantitativa;
- Uso de outras substâncias como fotossensibilizadores (psoraleno ou outras substâncias orgânicas);

REFERÊNCIAS

ACHER, A.; FISCHER, E.; TURNHEIM R.; MANOR, Y. Ecologically friendly wastewater disinfection techniques, **Water Research.**, p. 1398–1404, 1997.

ATKINS, P.W. **Quantum theory: techniques and applications**, in: **Physical Chemistry**, Oxford University Press, Oxford, p. 391–420, 1994.

BONACIN, J.A.; ENGELMANN, F.M.; SEVERINO, D.; TOMA, H.E.; BAPTISTA, M.S. Singlet Oxygen Quantum Yields in Water using Beetroot Extract and an Array of LEDs, **Journal Brazilian Chemistry Society**, p. 31-36, 2009.

BROWN, G.; FRANKL, D.; PHANG, T. Continuous infusion of methylene blue for septic shock. **Journal of Postgraduate Medicine**, p. 612-24, 1996.

CALZAVARA, P.G.P.; VENTURINI, M.; SALA, R. Photodynamic Therapy: Photochemistry and Photobiology. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, p. 293-302, 2007.

CAMINOS, D.A.; SPESIA, M.B.; DURANTINI, M.B. Photodynamic inactivation of Escherichia coli by novel meso-substituted porphyrins by 4-(3-N,N,N-trimethylammonium-propoxy) phenyl and 4-(trifluoromethyl) phenyl groups, **Photochemical and Photobiological Sciences**, p. 56–65, 2006.

CAVALHEIRO, F.M. **Avaliação da Redução Microbiana em Condutos Radiculares Contaminados Comparando Três Técnicas de Irradiação com Laser de Baixa Potência Associado a Fotossensibilizador**. 2007, 44 f. Dissertação (mestrado em Lasers em Odontologia) - Pesquisas Energéticas e Nucleares- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CHAN, Y.; LAI, C.H. Bactericidal Effects Of Different Laser Wavelengths On Periodontopathic Germs In Photodynamic Therapy. **Lasers in Medical Science**, p. 51, 2003.

COOPER A.T.; GOSWAMI, D.Y. A Survey of Solar Based Drinking Water Treatment, in: ASME International Solar Energy Conference, **Book of proceedings**, Albuquerque, New Mexico, p. 265–275, 1998.

DANIEL, L.A.; BRANDÃO, C.C.S; GUIMARÃES, J.R.; LIBÂNIO, M.; LUCA, S.J. Métodos alternativos de desinfecção de água. **Programa de Pesquisas em Saneamento Básico**. São Carlos. p. 12–13, 2005.

DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R.; Effect of Cell-Photosensitizer Binding and Cell Density on Microbial Photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2329, 2005.

_____. Photodynamic inactivation of microorganisms. **International Journal Immunopathology and Pharmacology**, p. 245, 2004.

DEVIENNE, K. F. **Avaliação da atividade biológica *in vitro* de isocumarinas naturais e semi-sintéticas obtidas de *Paepalanthus bromelioides***. Araraquara, 2000. 126f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista. 2000.

ELOFF, J. N.; SHAI, L.J.; MCGAW, L. J.; MASOKO, P. Antifungal and antibacterial activity of seven traditionally used South African plant species active against *Candida albicans*. **South African Journal of Botany**, p. 677-684, 2008.

EMBLETON M.L.; NAIR, S.P.; HEYWOOD, W.; DEV, C.M. COOKSON, B.D.; WILSON, M.. Development Of A Novel Targeting System for Lethal Photosensitization of Antibiotic-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy** - American Society For Microbiology. E.U.A., p. 3690-3696, 2005.

ERGAIEG K., CHEVANNE M., CILLARD J., SEUX R. Involvement of both Type I and Type II mechanisms in Gram-positive and Gram-negative bacteria photosensitization by a mesosubstituted cationic porphyrin. **The Official Journal of the International Solar Energy Society**, p. 1107-1117. 2008.

FERNANDEZ, J.M.; BILGIN, M.D.; GROSSWEINER, L. Singlet oxygen generation by photodynamic agents, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, p. 131-140, 1997.

FERRONATO, G.R.; SALMASO, M.H.S. **Avaliação de atividade antimicrobiana de espécies de macrófitas aquáticas da região de Curitiba**. 2010. 63f. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso Superior de Tecnologia em Química Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

FLOYD, R.A., SCHNEIDER, J.E., DITTME, D.P; Methylene blue photoinactivation of RNA viruses, **Antiviral Research**, p. 141–151, 2004.

GOLDING, P.S.; KING, T.A.; MADDOCKS, L.; DRUCKER, D.B.; AND BLINKHORN, A.S; Photosensitization of *Staphylococcus aureus* with malachite green isothiocyanate: inactivation efficiency and spectroscopic analysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, p. 202-210, 1998.

GOMES, V.B. **Atividade Antimicrobiana da Radiação Laser Nd:Yag, Frente a Anaeróbios do Sistema de Canais Radiculares: Estudo *In Vitro***. 2003, 79 f. Dissertação (mestrado em Odontologia) - Departamento de Prótese e Cirurgia, Buco-Facial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

HAMBLIM, M.R.; NEWMAN, E.L. Photosensitizer targeting in photodynamic therapy I. Conjugates of haematoporphyrin with albumin and transferrin. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, p. 13. 1994.

HAMBLIN MR, HASAN T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical and Photobiological Sciences**, p. 436–450. 2004.

HASHIMOTO, J.C. **Determinação de resíduos de verde de malaquita e verde de leucomalaquita em peixes por LC-ESI-MS/MS**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós Graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, São Paulo, 2010.

HIJNEN, W.A.M.; BEERENDONK, E.F.; MEDEMA, G.J. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. **National Library of Medicine**. p. 40, 2006.

JONES, N.F.; MONSTREY, S.; GAMBIER, B.A. Reability of the fibular osteocutaneous flap for mandibular reconstruction: anatomical and surgical confirmation. **Plastic and Reconstructive Surgery**, p. 707-716, 1996.

ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinamica: revisao da literatura e documentacao iconográfica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, p. 501-11, 2010.

KALKA, K.; MERK, H.; MUKHTAR, H.; Photodynamic Therapy In Dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, p. 389-413, 2000.

LAMBRECHTS, S.A.G.; ALDERS, M.C.G.; MARLE, J.V. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, p. 2026 – 2034, 2005

LAMBRECHTS, S.A.G.; DEMIDOVA, T.N.; AALDERSM, N.C.G.; HASAN, T.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* infected burn wounds in mice. **Photochemical and Photobiological Science**, p. 503-509, 2005.

LEVY, J.G. Photodynamic therapy, **Trends in Biotechnology**, p. 14-18, 1995.

ORTH, K.; RUCK, A.; STANESCU, A.; BEGER, H.G. Treatment of inoperable oesophageal tumours by intralesional photodynamic therapy with methylene blue. **Lancet**, p. 519-520, 1995.

MAISCH, T.; BOSL, C.; SZEIMIES, R.M.; LEHN, N.; ABELS, C. Photodynamic Effects of Novel XF Porphyrin Derivatives on Prokaryotic and Eukaryotic Cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 1542, 2005.

MACHADO, A.E.H. Photodynamic Therapy: principles, potential of application and perspectives. **Química Nova**, p. 237-243, 2000.

MEISEL, P.; KOCHER, T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: State of the art. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 251-60, 2005.

McLoughlin, O.A.; Kehoe, S.C.; McGuigan, K.G.; Duffy, E.F.; Al Touati, F.; Gernjak, W.; Oller, I.; Malato, S.; Gill, L.W. Solar disinfection of contaminated water: a comparison of three small-scale reactors. **Journal of Solar Energy Engineering**, p.657-664. 2004.

MELLO, J. B.; MELLO, G.P.S. Laser Em Odontologia, **Ed. Santos**. São Paulo. p. 81-82, 2000.

MENEZES, P.F.C. **Estudos Espectroscópicos E Citotóxicos Do Photogem® Fotodegradado E Dos Fotoprodutos Formados Pela Irradiação Com Laser**. 2006, 182 F. Tese (Doutorado Em Química Analítica) – Instituto De Química De São Carlos – Usp, São Carlos, 2006.

MERCHAT, M.; BERTOLONI, G.; GIACOMINI, P.; VILLANUEVA, A.; JORI, G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of Grampositive and Gram-negative bacteria, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, p. 153–157, 1996.

MÜLLER, F. **Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana Contra Bactérias Gram-Positivas: Estudo Comparativo Entre Fotossensibilizantes**. 2006. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2006.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; **Norma Aprovada – Segunda Edição**. NCCLS documento M27-A2, 2002.

_____. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; **Norma Aprovada - Sexta Edição**. NCCLS documento M7-A6, 2003.

NITZAN, Y.; GUTTERMAN, M.; MALIK, Z.; EHRENBERG, B. Inactivation of Gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins, **Photochemistry and Photobiology**, p. 89–96, 1992.

PASCHOAL, M. A. **Avaliação *in vitro* dos Efeitos da Terapia Fotodinâmica sobre Microrganismos Carcinogênicos Presentes na Saliva de Crianças**. 2009, 141 f. Dissertação (mestrado em Odontologia) – Faculdade de Bauru – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PELOI, L.S. **Estudos da aplicação do corante azul de metileno em Terapia Fotodinâmica**. 2007. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2007.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química. Nova**, p. 64-75, 2007.

PRATES, R. A. **Verde malaquita como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica: Ação bactericida sobre *Actinobacillus actinomycetemcomitans* - um estudo *in-vitro***. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS NUCLEARES, São Paulo, 2005.

ROSA, S.M.C. **Comparação do potencial fotodinâmico de três fotossensibilizadores associados a uma lâmpada de *leds* sobre culturas de *Enterococcus faecalis***. 2011. 58f. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2011.

REED, R.H.; MANI, S.K.; MEYER, V. Solar photo-oxidative disinfection of drinking water: preliminary field observations. **National Library of Medicine**. P. 432-436, 2000.

RIBEIRO, J.N.; JORGE, R.A.; SILVA, A.R.; FLORES, A.V.; RONCHI, I.M.; TEDESCO, A.C. Avaliação Da Atividade Fotodinâmica De Porfirinas Para Uso Em Terapia Fotodinâmica Através Da Fotoxidação De Triptofano. **Eclética Química**, p. 7 – 14, 2007.

ROBERT, J. Methylene azul in surgery of primary hyperparathyroidismo. **Journal: Ann Endocrinol**, p. 23-26, 1998,

ROSSIN, A.C. IN: **Técnica de abastecimento e tratamento de água**. Vol. 2. Cap.24. 3ª ed. São Paulo. CETESB; 1987.

SILVA, T.C.; SILVA, O.C.Jr.; ZUCOLOTO, S.; KURACHI, C.; FERREIRA, J.; BAGNATO, V.S. The use of light-emitting diodes to stimulate mitochondrial function and liver regeneration of partially hepatectomized rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, p. 1065-1069, 2007.

SOBSEY, M.D. Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection processes, **Water Science and Technology**, 179–195. 1989.

SOCRANSKY, S. Microbiologia da Doença Periodontal, in **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia oral**, G. Koogan, Editor. 1997: Munksgaard, Copenhagen. p. 92-126. 1997.

STERNBERG, E.D.; DOLPHIN, D. Pyrrolic photosensitizers, **Current Medicinal Chemistry**, 293-324, 1996.

STERNBERG, E.D.; DOLPHIN, D.; BRUCKNER C. Porphyrin-based photosensitizers for use in Photodynamic Therapy, **Tetrahedron**, 4151-4202, 1998.

TARDIVO, J.P.; GIGLIO, A.D.; OLIVEIRA, C.S.; GABRIELLI, D.S.; JUNQUEIRA, H.C.; TADA, D.B.; SEVERINO, D.; TURCHIELLO, R.F.; BAPTISTA, M.S. Photodynamic inactivation of microorganisms, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, p. 175, 2005.

TEICHERT, M.C; JONES, J.W; USACHEVA, M.N; BIEL, M.A. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiol Endod**, 155-160. 2002.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8ª.Ed. São Paulo: Editora Arned, p. 920. 2005.

VILLE´N, L.; MANJO´N, F.; GARCI´A-FRESNADILLO, D.; ORELLANA, G. Solar water disinfection by photocatalytic singlet oxygen production in heterogeneous medium. **Chemical Engineering Research Information Center**. 2006.

WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D.A.; MARLAND, J.; WAREING, D.R.; BOLTON, F.J. A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series, **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, p. 75-80. 1997

WAINWRIGHT, M.. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p13–28. 1998.

_____. The development of phenothiazinium photosensitizers, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, p. 263-272. 2005.

WILSON, M.; DOBSON, J.; SARKAR, S. Sensitization Of Periodontopathogenic Bacteria To Killing By Light From A Low-Power Laser. **Oral Microbiology and Immunology**, p. 182-187. 1993.

ZHANG, L.Z.; TANG, G.Q.. The Binding Properties Of Photosensitizer Methylene Blue To Herring Sperm DNA: A Spectroscopic Study, **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, p. 119–125. 2004