



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**LUDYMILA ROSA BATISTA SILVA**

**INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE *Saccharomyces cerevisiae***  
**UTILIZANDO ROSA DE BENGALA ADSORVIDO EM QUITOSANA**

**UBERLÂNDIA**

**2018**

LUDYMILA ROSA BATISTA SILVA

**INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE *Saccharomyces Cerevisiae*  
UTILIZANDO ROSA DE BENGALA ADSORVIDO EM QUITOSANA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Química da Universidade  
Federal de Uberlândia como requisito parcial  
para obtenção do título de Bacharel em  
Química Industrial.

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira

UBERLÂNDIA

2018

LUDYMILA ROSA BATISTA SILVA

**INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE *Saccharomyces Cerevisiae*  
UTILIZANDO ROSA DE BENGALA ADSORVIDO EM QUITOSANA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Química da Universidade  
Federal de Uberlândia como requisito parcial  
para obtenção do título de Bacharel em  
Química Industrial.

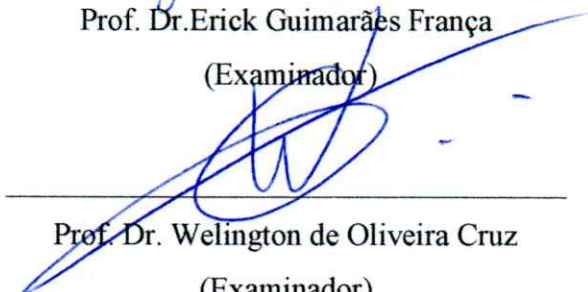
Uberlândia, 23 de novembro de 2018



Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira  
(Orientador)



Prof. Dr. Erick Guimarães França  
(Examinador)



Prof. Dr. Welington de Oliveira Cruz  
(Examinador)

*Dedico este trabalho à minha mãe meu maior presente de Deus, e minha maior inspiração.*

*“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas.”*

*Claude Lévi-Strauss*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus guias espirituais, e à Deus quem me reergue em cada momento de desespero, me mostrando que eu poderia ir além.

À minha mãe, meu exemplo, meu maior amor, minha inspiração, e quem esteve comigo em cada palavra, em cada teste, em cada lágrima, e quem sempre me fez continuar em frente, me mostrando que eu ia conseguir concluir. Por acreditar em mim de uma forma que ninguém mais acreditou, essa vitória é mais sua que minha, obrigada por cada milésimo de segundo de todo seu amor dedicado a mim e a este trabalho.

A minha madrinha Cláudia, que mesmo tão distante como minha segunda mãe, acreditou em mim, independente de cada uma das fases que passei para concluir este trabalho, obrigada por cada oração, por cada conselho, por cada sorriso nos dias de desespero, e obrigada por acreditar em mim.

Ao professor Carlos Alberto de Oliveira, que não sei de forma alguma descrever o tamanho do coração, que jamais foi imponente, jamais abdicou de ensinar seus conhecimentos, sempre com paciência, entendendo cada fase que passei, a cada dúvida, cada problema. Nada acontece por acaso e tê-lo como meu orientador foi um presente de Deus durante essa graduação, e agradeço muito por ter estado ao meu lado durante esses anos, foram experiências, risos, choros, desesperos, e aprendizados que jamais serão esquecidos, obrigada por acreditar em mim, e por me mostrar que “não são aparelhos sofisticados que o tornam um bom cientista/químico, e sim o quão discutível torna-se cada observação feita dentro do laboratório, não são os resultados certos que nos tornam bons, e sim os errados que nos levam ao caminhos de novas discussões e estudos”.

À Denise, passamos ao mesmo tempo por todo desespero, apoiamos uma à outra, com palavras, mensagens enviadas de madrugada, puxões de orelha, risadas e inúmeros açaís, agradeço imensamente a Deus por coloca-la em meu caminho, fazendo com que estivesse junto a mim nessa caminhada tão difícil de ser trilhada.

À Layani, por me apoiar em cada momento de desespero, e me fazer enxergar mesmo quando eu estava desacreditada de tudo, me acalmou, me apoiou, me mostrou que Deus estava junto a mim, e que tudo ficaria bem, sou muito grata a amizade que viemos construindo.

A Luiza, quem me acolheu na 6ª turma e no LABIOFOT, sou muito grata por toda ajuda que me concedeu, uma pessoa extremamente doce e paciente, não mede esforço nenhum em ajudar e passar tudo aquilo que sabes, de contas a confissões pessoais, foi de extrema importância por toda minha caminhada, gratidão por cada momento junto a você.

A Simone, que esteve comigo desde o primeiro dia de aula, passando por cada prova, cada sufoco, cada risada e choro dentro do LABIOFOT, que por alguns dias se tornou nossa segunda casa, e foram muitos dias difíceis, mas também muitos dias bons que passamos ali dentro, dias que nos tornaram pessoas melhores e maior carga de conhecimento de quando pisamos lá dentro a primeira vez. Obrigada por toda ajuda, por todas as vezes que me ouviu e todas as vezes que juntas repetimos mais uma vez os mesmos testes.

A todos os professores e colegas de sala que cruzaram meu caminho durante toda essa jornada, seja em sala de aula, ao LABIOFOT, de alguma forma todos foram colocados por Deus em meu caminho para me ajudar nesta caminhada.

Aos técnicos, em especial ao André, que foi um segundo orientador, sempre ali auxiliando em tudo que fosse preciso, e fazendo sempre os momentos de descontração em meio a tanto stress, obrigada Andrezão por sempre nos salvar com aquela vidraria, aquele reagente, e a água destilada nossa de todos os dias.

A FAPEMIG e CNPq pelas bolsas concedidas durante a graduação.

## RESUMO

Quitosana é um biopolímero natural obtido a partir da desacetilação química da quitina. O interesse em pesquisas por novas aplicações deste polissacarídeo aumenta em diversas áreas visto às suas características biológicas e físico químicas, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, formação de filmes e como nanocarreador de drogas químicas diversas para processos de fotoinativação de microrganismos. O processo de fotoinativação baseia-se na administração tópica ou sistêmica de um corante não tóxico sensível à luz, seguida da irradiação em baixas doses com luz visível de comprimento de onda adequado. O presente trabalho avaliou a eficácia antibacteriana da adsorção em quitosana do corante xanteno Rosa de Bengala (RB), em relação a eficácia da efetividade antibacteriana do corante livre em solução. Foram analisados o melhor solvente entre meio aquoso e salino, para que os mesmos não causassem danos a levedura *Saccharomyces Cerevisiae*. Foram realizadas análises de caracterização espectral do corante através de espectros na região do ultravioleta e visível (UV-vis), obtendo o comprimento de onda máximo do corante para produção do sistema de irradiação, composto por LED 96 na cor verde, estando dentro da faixa de absorção máxima de 550 nm do fotossensibilizador, o corante Rosa de Bengala. Imagens microscópicas mostram que o corante quanto em sua forma livre, quanto agregado ao polissacarídeo não possui o processo de metacromasia. Os testes de fotoinativação do corante livre mostraram que a menor dose aplicada (12,5  $\mu\text{M}$ ) do corante foi a mais eficaz na inibição do crescimento de Unidades formadoras de colônias (UFC's) viáveis. A adsorção foi realizada através do processo de diálise, sendo realizada em 48 horas intervaladas para escolha do tempo ideal de adsorção do corante ao biopolímero quitosana. O menor tempo de processo de diálise mostrou-se mais eficaz para agregação biopolímero/corante, porém a interação entre eles diminuiu a eficácia da inibição da taxa de crescimento de microrganismos.

**Palavras-chave:** Quitosana; Rosa de Bengala; Fotoinativação, Metacromasia; *Saccharomyces Cerevisiae*.

## ABSTRACT

Chitosan is a natural biopolymer obtained from the chemical desacetylation of chitin. The interest in research for new applications of this polysaccharide allows biological and physical chemical characteristics such as biocompatibility, biodegradability, drug formation and mast cell nanocarrier may be different for photoinactivation processes of microorganisms. The photoactivation process is based on the topical or systemic administration of a non-toxic dye sensitive to light, then on low dose irradiation with suitable wavelength visible light. The present work evaluated the antibacterial of chitosan adsorption of xanthene Bengal Rose (RB), in relation to the effectiveness of the antibacterial of the dye in solution. The spatialces cerevisiae is an oracle obliterate the yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. The spectral spectral spectroscopy of ultraviolet and visible spectral region (UV-vis), obtaining the maximum dye wave size for the production of the irradiation system, consisting of LED 96 in the green color of the maximum power of 550 nm from the photosensitizer, the pink dye of Bengal. . Microscopic images show that the dye for its free form, relatively attached to the polysaccharide, does not have the process of metachromasia. The free dye photoinitiation tests were more than the applied dose (12.5  $\mu$ M) of the dye was most effective in inhibiting the growth of viable Colony Forming Units (CFU's). The adsorption was carried out during the dialysis process, being carried out in 48 hours to select the ideal time of adsorption of the dye to the chitosan biopolymer. The shorter dialysis time is more effective for biopolymer / dye aggregation, but there is an interaction between them in inhibiting the growth rate of microorganisms.

**Keywords:** Chitosan; Rose Bengal; Photodynamic inactivation, Metachromasy; *Saccharomyces Cerevisiae*.

## LISTA DE FIGURAS

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |           |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>FIGURA 1</b>  | Diagrama de Jablonski                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <b>1</b>  |
| <b>FIGURA 2</b>  | Mecanismos (Tipo I e II) de geração de ROS pela combinação de luz, fotossensibilizador (FTS) e oxigênio no estado fundamental ( $^3\text{O}_2$ ).                                                                                                                                                                    | <b>5</b>  |
| <b>FIGURA 3</b>  | Representação esquemática genérica para corantes Xantêmicos. No destaque, estrutura do anel xantêmico.                                                                                                                                                                                                               | <b>8</b>  |
| <b>FIGURA 4</b>  | Estrutura química corante xantênico Rosa de Bengala (RB).                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>9</b>  |
| <b>FIGURA 5</b>  | Esquema da estrutura polimérica da cadeia quitina (y) - quitosana (x). A Quitina é a acetilglicosamina (1-4)-ligada 2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glican e a quitosana é a glicosamina (1-4)-ligada 2-amina-2-deoxi- $\beta$ -Dglican. Quitosana são tipicamente formadas por várias razões y:x, onde $y \leq x$ . | <b>10</b> |
| <b>FIGURA 6</b>  | Expansão cepas da levedura <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>                                                                                                                                                                                                                                                           | <b>15</b> |
| <b>FIGURA 7</b>  | Sistema de irradiação de LED verde                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <b>16</b> |
| <b>FIGURA 8</b>  | Sistema de diálise de produção de compósito Rosa de Bengala/Quitosana. (a) Sistema de diálise isento de luminosidade sobre chapa com agitação (b) Sacos de dialise recheados com quitosana submersos em solução de corante (c) Saco com solução de compósito pós processo de diálise.                                | <b>17</b> |
| <b>FIGURA 9</b>  | Imagens microscópicas da levedura <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> . (A) Microscopia óptica aumento de 1000X. (B) Células após tratamento em solução aquosa de RB (C) Células após tratamento em solução salina de RB.                                                                                                | <b>18</b> |
| <b>FIGURA 10</b> | Espectros de absorção do corante Rosa de Bengala (RB) (a) em meio aquoso, (b) em meio salino                                                                                                                                                                                                                         | <b>19</b> |
| <b>FIGURA 11</b> | Lâminas revestida com quitosana e solução de RB de alta concentração para análise de metacromasia                                                                                                                                                                                                                    | <b>21</b> |
| <b>FIGURA 12</b> | Imagens microscópicas de Coloração do <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> promovida pelos corantes azul de metileno, azul de toluidina e Rosa de Bengala.                                                                                                                                                                | <b>22</b> |

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |           |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>FIGURA 13</b> | Gráfico de concentração por absorvância para curva de calibração do corante Rosa de Bengala.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>25</b> |
| <b>FIGURA 14</b> | Viabilidade celular método SP-SDS de colônias de <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> utilizando-se de corante Rosa de Bengala nas concentrações de 50, 25, e 12,5 µM, respectivamente as letras A, B e C, grupo controle pertencentes as figuras de letra D, número 1 refere-se aos testes em presença de luz, e número 2 aos testes em ausência de luz, em várias diluições seriadas (nº 1= 10 <sup>-1</sup> ; nº2 = 10 <sup>-2</sup> ; nº3= 10 <sup>-2(1/2)</sup> ; nº4= 10 <sup>-4</sup> ; nº5=10 <sup>-5</sup> e nº6= 10 <sup>-6</sup> ). | <b>26</b> |
| <b>FIGURA 15</b> | Gráfico de contagem de UFC's viáveis após teste de avaliação de fotoinativação microbiológica.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>28</b> |
| <b>FIGURA 16</b> | Espectro de absorção composto Rosa de Bengala / Quitosana                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <b>30</b> |
| <b>FIGURA 17</b> | Viabilidade celular método SP-SDS de colônias de <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> utilizando-se de composto Rosa de Bengala/Quitosana nas concentrações de 12,5 µM. A1 sem presença de luz e A2 com presença de luz.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>31</b> |
| <b>FIGURA 18</b> | Gráfico de contagem de UFC's viáveis após teste de avaliação de fotoinativação microbiológica com composto com e sem irradiação, respectivamente C+L e C-L, corante não ligado a biomolécula com e sem presença de irradiação, respectivamente RB+L e RB-L, e testes de controle também com e sem radiação, respectivamente CO+L e CO-L.                                                                                                                                                                                                  | <b>31</b> |
| <b>FIGURA 19</b> | Cepa de <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> após tratamento com composto Rosa de Bengala e quitosana.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <b>32</b> |
| <b>FIGURA 20</b> | Solução de corante e quitosana após armazenamento depois do processo de diálise.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <b>35</b> |

## **LISTA DE TABELAS**

|                 |                                                                                                             |           |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>TABELA 1</b> | Vias fotocitotóxicas causadas por fotossensibilizador frente a TFD em células microbianas.                  | <b>6</b>  |
| <b>TABELA 2</b> | Valores de intensidade luminosa de acordo com posições do sistema de irradiação.                            | <b>23</b> |
| <b>TABELA 3</b> | Energia para cada posição do sistema de irradiação                                                          | <b>24</b> |
| <b>TABELA 4</b> | Dados de concentração e absorbância curva de calibração do corante Rosa de Bengala.                         | <b>24</b> |
| <b>TABELA 5</b> | Dados de concentração por tempo do compósito RB na concentração inicial de 50 $\mu\text{M}$ em quitosana.   | <b>25</b> |
| <b>TABELA 6</b> | Dados de concentração por tempo do compósito RB na concentração inicial de 12,5 $\mu\text{M}$ em quitosana. | <b>30</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

**CI** conversão interna

**CIS** cruzamento inter-sistema

**et al.**, e colaboradores

**Da** Dalton

**FS** fotossensibilizador, fotossensitizador

**HOMO** Highest Occupied Molecular *Orbital*

**I**: Intensidade

**IFDMO** inativação fotodinâmica de microrganismos

**J**: joules

**J/cm<sup>2</sup>**: Joules por centímetro quadrado

**LED** Diodos Emissores de Luz (em inglês, *Light Emitting Diode*)

**LUMO** *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*

**mL**: Mililitro

**mW**: Miliwatts

**mW/cm<sup>2</sup>**: Miliwatts por centímetro quadrado

**µg/mL**: Microgramas por mililitro

**µM** : Micromolar

**nM** nanômetros

**O<sub>2</sub>** Oxigênio Molecular

**<sup>3</sup>O<sub>2</sub>** Oxigênio tripleto

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>\*** Oxigênio Singleto

**PDT** *Photodynamic Therapy*

**ROS** Espécies Reativas de Oxigênio

**s:** Segundos

**S<sup>0</sup>:** Estado eletrônico fundamental

**S<sup>1</sup>:** Estado eletrônico excitado singleto

**T:** tempo

**T<sup>1</sup>:** Estado excitado tripleto

**TFD** Terapia Fotodinâmica

**UV-vis** Ultravioleta visível

**UFC'(s):** Unidades formadoras de colônia(s)

**UFC/mL:** Unidades formadoras de colônia por mililitro

**V:** Volts

**W:** watts

**W/cm<sup>2</sup>:** watts por centímetro quadrado

**λ :** Lambda (comprimento de onda)

**% :** Porcentagem

## SUMÁRIO

|          |                                                                                  |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>                                                                | <b>1</b>  |
| 1.1      | PROCESSOS FOTOFÍSICOS                                                            | 1         |
| 1.2      | TERAPIA FOTODINÂMICA                                                             | 3         |
| 1.2.1    | MECANISMO TERAPIA FOTODINÂMICA                                                   | 4         |
| 1.2.2    | FONTES DE LUZ NA PDT                                                             | 7         |
| 1.3      | FOTOSENSIBILIZADORES                                                             | 7         |
| 1.3.1    | CORANTES XANTÊNICOS COMO FOTOSENSIBILIZADORES                                    | 8         |
| 1.3.2    | CORANTE ROSA DE BENGALA                                                          | 9         |
| 1.4      | QUITOSANA                                                                        | 10        |
| 1.5      | SACCHAROMYCES CEREVISIAE                                                         | 11        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b>                                                                 | <b>13</b> |
| <b>3</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                                       | <b>14</b> |
| 3.1      | MATERIAIS                                                                        | 14        |
| 3.2      | MÉTODOS                                                                          | 14        |
| 3.2.1    | PREPARAÇÃO DA CULTURA MICROBIOLÓGICA                                             | 14        |
| 3.2.2    | AVALIAÇÃO DE SOLVENTE APROPRIADO À AVALIAÇÃO<br>DE FOTOINATIVAÇÃO MICROBIOLÓGICA | 15        |
| 3.2.3    | AVALIAÇÃO FOTOFÍSICA                                                             | 15        |
| 3.2.4    | AVALIAÇÃO SISTEMA DE IRRADIAÇÃO                                                  | 16        |
| 3.2.5    | AVALIAÇÃO DA FOTOINATIVAÇÃO MICROBIOLÓGICA                                       | 16        |
| 3.2.5.1  | PRODUÇÃO DO COMPÓSITO QUITOSANA/CORANTE ROSA DE<br>BENGALA                       | 16        |
| 3.2.5.2  | ENSAIOS DE FOTOINATIVAÇÃO                                                        | 17        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                    | <b>18</b> |
| 4.1      | AVALIAÇÃO DE SOLVENTE APROPRIADO À AVALIAÇÃO DE<br>FOTOINATIVAÇÃO MICROBIOLÓGICA | 18        |
| 4.2      | AVALIAÇÃO FOTOFÍSICA: ESPECTROS DE ABSORÇÃO                                      | 19        |
| 4.3      | AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE IRRADIAÇÃO                                               | 23        |
| 4.4      | PRODUÇÃO COMPÓSITO QUITOSANA/CORANTE ROSA DE<br>BENGALA                          | 24        |

|            |                                                |           |
|------------|------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.5</b> | <b>AVALIAÇÃO FOTOINATIVAÇÃO MICROBIOLÓGICA</b> | <b>26</b> |
| <b>5</b>   | <b>CONCLUSÕES</b>                              | <b>34</b> |
| <b>6</b>   | <b>TRABALHOS FUTUROS</b>                       | <b>35</b> |
| <b>7</b>   | <b>REFERÊNCIAS</b>                             | <b>36</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

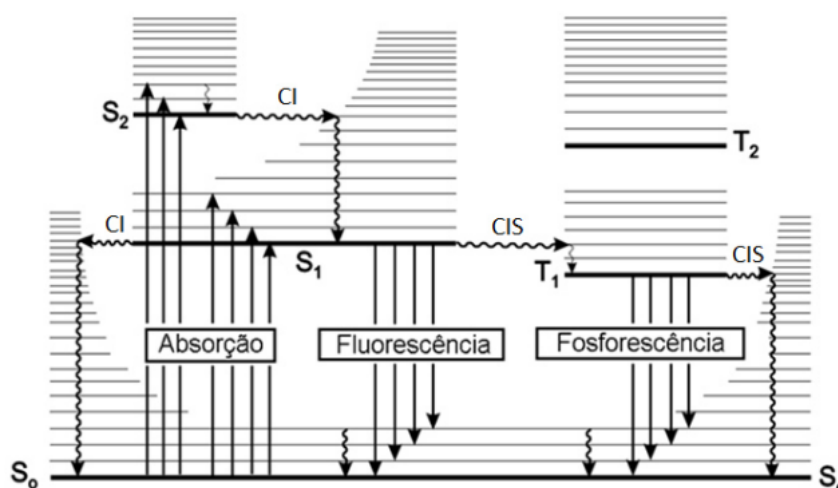
Vivemos em uma época de expansão tecnológica e científica, na qual há uma crescente conscientização sobre a resistência dos microrganismos aos antimicrobianos, ocasionando uma constante busca pelo desenvolvimento de tratamentos alternativos e/ou coadjuvantes. Assim, mediante esta resistência ocasionada, principalmente, pelo uso frequente e indevido dos antibióticos, limitando a eficiência dos tratamentos convencionais, a Terapia Fotodinâmica (PDT, do inglês, Photodynamic Therapy) surge como uma modalidade terapêutica adjuvante para contribuir no desenvolvimento do controle de microrganismos.

### 1.1 PROCESSOS FOTOFÍSICOS

A fotofísica é compreendida como o estudo dos mecanismos físicos que resultam da interação entre matéria e a radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta/visível (UV-vis).

A existência das diferentes cores está ligada à natureza ondulatória da luz e aos processos de absorção e emissão de luz por compostos cromóforos. Estes processos, de natureza fotofísica, podem ser compreendidos simplificadaamente através do diagrama de Jablonski (Figura 1). Diagrama de Jablonski, representação esquemática dos processos de ativação e desativação do estado excitado. (PEREIRA, 2013; ALMEIDA,2016).

**Figura 1:** Diagrama de Jablonski



Fonte: (PEREIRA, 2013; ALMEIDA,2016).

As transições envolvendo processos radiativos são representadas pelas setas retas. Os processos não radiativos de conversão interna (CI) e cruzamento inter-sistema (CIS) são representadas por setas onduladas. Nele estão esquematizados os processos radiativos de absorção e emissão, os processos não radiativos (setas onduladas), bem como estados de energia dos elétrons. (PEREIRA, 2013; ALMEIDA, 2016).

Quando o sítio cromóforo de uma molécula absorve um fóton, elétrons no orbital HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) são promovidos para o orbital LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital), ou seja, os elétrons que ocupam o orbital molecular de maior energia, absorvem a energia do fóton sendo promovidos para o orbital desocupado de menor energia. Quando a desativação ocorre, o elétron retorna ao orbital de origem liberando o excesso de energia de forma radiativa ou térmica (não radiativa). O decaimento a partir dos níveis energéticos superiores até o primeiro estado excitado ( $S_n \rightarrow S_1$ ) se dá de forma rápida e não radiativa, num processo chamado conversão interna (CI), no qual a desativação se dá por meio de colisões que dispersam a energia através dos movimentos de vibração, rotação e translação das moléculas. (PEREIRA, 2013; ALMEIDA, 2016).

Além da CI existe um mecanismo que compete com a emissão de fluorescência na desativação do estado  $S_1$ . Este processo consiste na mudança de multiplicidade do estado excitado singleto para o estado excitado tripleto ( $S_1 \rightarrow T_1$ ) e denomina-se cruzamento inter-sistema (CIS), ocorrendo quando existe um nível vibracional comum, isto é, de mesma energia, para ambos. Embora seja um processo quântico proibido (ocorra com menor probabilidade), a mudança no spin eletrônico pode ocorrer se o acoplamento dos momentos magnéticos gerados pelo spin e pela órbita do elétron for grande o suficiente para torná-lo possível. (PEREIRA, 2013; ALMEIDA, 2016; MACHADO, 2000).

A iluminação e, conseqüente, ativação de um fotossensibilizador (FS) utilizando luz de comprimento de onda adequado ao seu intervalo de absorção eletrônica, na presença de oxigênio, consiste no princípio fundamental das modalidades clínicas conhecidas como Terapia Fotodinâmica (TFD) e inativação fotodinâmica de microrganismos (IFDMO). (ALMEIDA, 2016; MACHADO, 2000).

## 1.2 TERAPIA FOTODINÂMICA

A Terapia Fotodinâmica (TFD) baseia-se na administração tópica ou sistêmica de um corante não tóxico sensível à luz seguida da irradiação em baixas doses com luz visível de comprimento de onda adequado. Colorantes (corantes e pigmentos) são caracterizados pela sua habilidade de absorver luz visível. A cerca de 10.000 desses compostos químicos coloridos tem sido produzido em escala industrial. Em função do fato de absorverem luz com elevada eficiência, em alguma região do espectro visível, alguns desses compostos participam e induzem ou participam de reações fotoquímicas, que levam à formação de espécies capazes de efetuar a destruição de um alvo biológico. (PERUSSI,2007; SILVA,2012)

A Terapia Fotodinâmica parte do princípio de que a interação de luz de comprimento de onda adequado com um composto não tóxico (fotossensibilizador) e oxigênio, resulta em espécies reativas capazes de induzir a inviabilização de células, que causa a morte dos microrganismos (MACHADO,2000). Ao receber a energia do fóton em comprimento de onda ( $\lambda$ ) específico, o FS passa para o estado excitado singleto ( $S_1$ ), que sofre cruzamento inter-sistema chegando ao estado excitado tripleto ( $T_1$ ), que é a condição favorável para a transferência de energia para as moléculas de oxigênio. (ALMEIDA,2016).

Há mais de 4.000 anos atrás os egípcios deram início a essa terapia, através da ingestão de plantas (contendo os psoralenos, furo[3,2-g]-coumarina ou ácido 6-hidroxi-5-benzofuranoacrilico-lactona) e luz solar, para tratar doenças como o vitiligo. Entretanto, a técnica começou a ser empregada com sistemática científica apenas bem recentemente. (SIMPLÍCIO; MAIONCHI; HIOKA,2002).

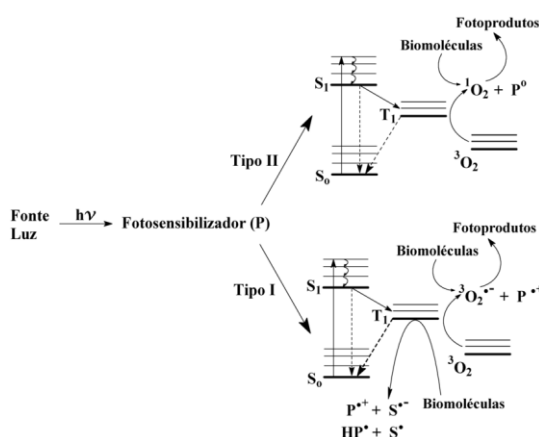
O fotossensibilizador pode se ligar às células microbianas por diferentes caminhos como interação eletrostática e difusão. É conhecido que bactérias Gram-positivas e fungos são mais suscetíveis a inativação fotodinâmica que as bactérias Gram-negativas, que possuem uma bicamada lipídica na sua membrana externa que dificulta a penetração das substâncias. Fungos e bactérias Gram-positivas tem uma facilidade maior em absorver os corantes, facilitando o processo de fotossensitização. Ambas as bactérias e fungos são mais suscetíveis a fotossensibilizadores catiônicos devido à maior interação eletrostática com a superfície do corpo celular. (ERGAIEG; SUEX, 2009).

### 1.2.1 MECANISMO TERAPIA FOTODINÂMICA

A ação da TFD baseia-se na administração tópica ou sistêmica de um cromóforo (corante/fotossensibilizador) não tóxico sensível à luz seguida da irradiação em baixas doses com luz visível de comprimento de onda adequado (LIMA,2013). A ação da luz sobre o fotossensibilizador inicia processos fotofísicos, culminado em processos fotoquímicos em cadeia, que se propagam na presença de oxigênio e promovem ataque por radicais livres e/ou espécies oxidantes para desencadeamento de processo fotobiológico de morte celular (apoptose) e destruição do tecido biológico, componentes de células tumorais, vírus, fungos e bactérias. (ALMEIDA,2016; MACHADO,2000; LIMA,2013).

Muitos pigmentos orgânicos possuem níveis de energia adequados para realizar transferência de energia para o oxigênio molecular ( $O_2$ ). Assim, a molécula de  $O_2$ , que ocorre naturalmente no estado tripleto ( $^3O_2$ ), é fotoexcitado pelo fotossensibilizador indo para o estado singleto ( $^1O_2^*$ ) podendo reagir com biomoléculas e gerar espécies reativas de oxigênio (ROS do inglês, reactive oxygen species) tais como peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e radical superóxido que destrói por oxidação das células. Neste processo o estado fundamental singleto do fotossensibilizador é excitado para o estado excitado singleto, podendo decair para seu estado fundamental através da emissão de luz ou através de relaxação vibracional, gerando calor ou ainda ocorrer o processo de cruzamento intersistemas, no qual sofre a inversão de spin, conduzindo a molécula para o estado excitado tripleto. A energia do estado excitado tripleto pode ser dissipada pelo processo de fosforescência, devolvendo a molécula para o estado fundamental, como ilustrado na Figura 2.

**Figura 2:** Mecanismos (Tipo I e II) de geração de ROS pela combinação de luz, fotossensibilizador (FTS) e oxigênio no estado fundamental ( $^3O_2$ ).



Fonte: (RIBEIRO, et al, 2007).

O processo de reação TFD, pode ocorrer por dois mecanismos de reação: por transferência de elétrons ou por transferência de energia, que são chamados de mecanismo Tipo I e Tipo II, respectivamente.

No mecanismo tipo I, o fotossensibilizador no estado excitado interage diretamente com um substrato orgânico e/ou outras moléculas vizinhas (preferencialmente  $O_2$ ), produzindo radicais ou íons radicais através de reações de transferência de átomos de hidrogênio ou de elétrons. A maioria destes radicais reage instantaneamente com o  $O_2$ , gerando uma mistura complexa de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e hidroxila ( $\bullet OH$ ), os quais são capazes de oxidar uma variedade de biomoléculas.

No mecanismo tipo II obtém-se oxigênio singlete, altamente reativo, através da transferência de energia do fotossensibilizador no estado tripleto excitado para o estado tripleto fundamental do oxigênio. Em razão das reações de transferência de energia serem mais rápidas do que as reações de transferência de elétrons, o mecanismo tipo II é geralmente favorecido nas reações de fotooxidação. O oxigênio singlete, quando gerado, pode reagir com lipídeos insaturados (incluindo colesterol), aminoácidos e ácido nucléicos. Lipídeos insaturados e proteínas são os principais constituintes das membranas biológicas. Portanto, as reações fotoxidativas ocasionam alterações da permeabilidade celular, provocando a morte do tecido tumoral via necrose ou apoptose. (RIBEIRO, et al, 2007).

O fotossensibilizador no estado tripleto pode ser submetido a várias vias fotocitotóxicas e provocar diferentes eventos citotóxicos dependendo de sua localização, essas vias estão relacionadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Vias fotocitotóxicas causadas por fotossensibilizador frente a TFD em células microbianas.

| Áreas de ação                                              | Ação                                | Resultado                                        | Consequência                                                     | Efeito citotóxico                                                              |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Água                                                       | Abstração (remoção) do hidrogênio   | Formação do radical hidroxila (OH <sup>-</sup> ) | Formação de peróxido e superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) | Processos oxidativos adicionais                                                |
| Parede/membrana celular, lipídeos e esteroides insaturados | Peroxidação                         | Peroxidação                                      | Formação de hidroperóxido                                        | Permeabilidade aumentada aos íons (perda de Na <sup>+</sup> / K <sup>+</sup> ) |
| Peptídeos                                                  | Abstração do hidrogênio             | Ligação cruzada de peptídeos                     | Inativação enzimática                                            | Perda da facilidade de reparo; lise                                            |
| Cobertura proteica viral                                   | Oxidação de resíduos de aminoácidos | Degradação de proteínas                          | Perda da infectividade viral                                     | Cobertura protéica viral                                                       |
| Cadeia respiratória                                        | Reações de oxidação e redução       | Inibição da respiração                           | Cadeia respiratória                                              | Reações de oxidação e redução                                                  |
| Enzimas citoplasmáticas e enzimas virais                   | Oxidação ou ligações cruzadas       | Inibição do conjunto ribossômico; inibição da    | Enzimas citoplasmáticas/e nzymas                                 | Oxidação ou replicação/ infectividade                                          |
| Resíduos de ácido nucléico (tipicamente guanosina)         | Oxidação da base ou do açúcar       | 8-hidroxi-guanosina                              | Degradação nucleotídica; degradação do açúcar/clivagem           | Partição; mutação; inibição da replicação                                      |

Fonte: (ADAPTADO; ALVES,2011)

### 1.2.2 FONTES DE LUZ NA PDT

No presente trabalho, a avaliação luminescente ocorreu através de Diodos Emissores de Luz (em inglês, Light Emitting Diode - LED), que são estruturas compostas por dois materiais semicondutores nos quais, em sua junção, por diferença de cargas, ocorre a emissão de luz, sem aumento de temperatura. Estes dispositivos emitem luz por meio da movimentação de elétrons através de diferentes materiais semicondutores, produzindo uma emissão espontânea de fótons não coerentes, diferindo-se dos lasers, que produzem emissão estimulada de radiação. Uma característica importante observada na radiação emitida pelos LED é que, em lugar de sua frequência ser aleatória, como no caso da lâmpada incandescente que se espalha pelo espectro, ela tem uma frequência muito bem definida, que depende do tipo de material usado no semicondutor. Os *LED* podem ser configurados para produzir comprimentos de onda múltiplos, podendo ser arranjados em larga escala, não produzindo calor. (ALVES,2011)

### 1.3 FOTOSSENSIBILIZADORES

Preparações iniciais de fotossensibilizadores, para terapia fotodinâmica, basearam-se em uma mistura complexa de porfirinas, denominados de derivados da hematoporfirina. Extensas pesquisas químicas e biológicas foram realizadas nos últimos 20 anos para identificar novos fotossensibilizadores que pertencem a diferentes classes de compostos.

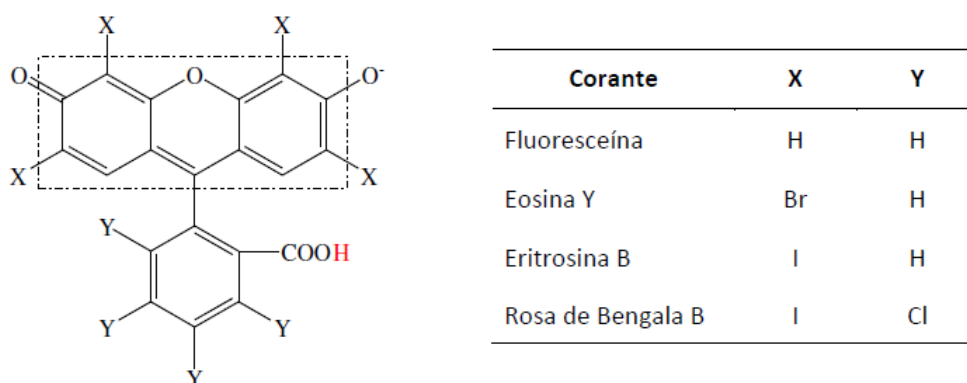
O fotossensibilizador é uma substância cromófora (corante), tornando-se o principal agente ativador do processo fotodinâmico. No entanto, os fotossensibilizadores devem possuir características adequadas para serem utilizados em TFD, dentre as quais destacam-se as seguintes (LIMA,2013; RIBEIRO, et al, 2007):

- Alto rendimento quântico do estado tripleto, que leva a um alto rendimento quântico de oxigênio singleto;
- Baixo rendimento quântico de reações de fotobranqueamento, onde a estrutura do corante se modifica, resultando na perda dos sítios cromofóricos.
- Alto coeficiente de absortividade molar em comprimentos de onda situados no intervalo de 600-800 nm, faixa do espectro eletromagnético conhecida como janela fotodinâmica ou janela fototerapêutica.

### 1.3.1 CORANTES XANTÊNICOS COMO FOTOSSENSIBILIZADORES

Os xantenos são compostos cíclicos que apresentam três anéis aromáticos em arranjo linear, apresentando um átomo de oxigênio no anel central (Figura 3). A Fluoresceína, Eosina Y, Eritrosina B e a Rosa de Bengala B, são alguns exemplos desta classe de corantes (PERUSSI, 2007). Os corantes xantênicos halogenados absorvem luz visível num comprimento de onda máximo entre 480 - 550 nm, ou seja, fora da denominada janela fototerapêutica em TFD (região entre 600 - 800 nm). Mesmo assim, eles apresentam propriedades interessantes e têm sido utilizados em TFD aplicada na superfície corpórea, contra tumores que possam ser iluminados através de sondas introduzidas nas cavidades corpóreas, em aplicações odontológicas e também na inativação fotodinâmica de microrganismos (IFDMO). (PEREIRA,2013)

**Figura 3:** Representação esquemática genérica para corantes Xantênicos. No destaque, estrutura do anel xantênico



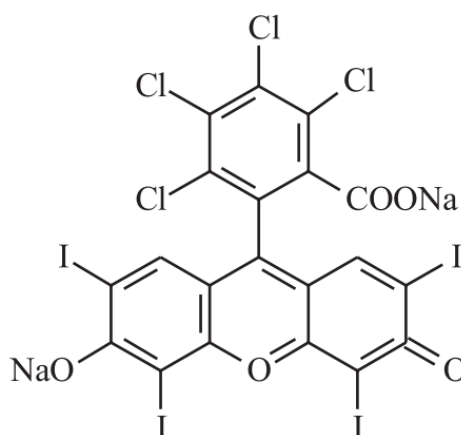
Fonte: (PEREIRA,2013).

Um ponto fundamental é a disposição espacial das duas partes da molécula. O anel xantênico – planar – se encontra rotacionado a um ângulo de aproximadamente 90° em relação ao anel benzóico (PEREIRA,2013). Devido a essa geometria quase perpendicular entre os dois planos, os orbitais moleculares têm pouca sobreposição, de forma que não existe efeito de conjugação entre as duas partes (SONG, 2000). Como as características fotofísicas dessa classe de corantes se deve aos sítios cromofóricos situados na porção xantêmica da molécula, modificações na região do anel benzóico não afetariam propriedades importantes como o rendimento quântico de  $^1\text{O}_2$ . (PEREIRA,2013; SONG,2000).

### 1.3.2 CORANTE ROSA DE BENGALA

O fotossensibilizador avaliado nesse estudo é o xanteno Rosa de Bengala (RB), um derivado tetraiodado e tetraclorado da fluoresceína sódica ( $C_{20}H_2Cl_4I_4O_5$ ), que possui quatro átomos de iodo substituídos diretamente na estrutura xantênica e quatro átomos de cloro ligados ao anel benzoico, como mostra a figura 4. O composto foi sintetizado originalmente por Gnem em 1884, para ser usado como corante de tecido em Bengala, na Índia. O composto sólido apresenta coloração rosa-púrpura e, dentre outras aplicações comerciais, tem sido utilizado na formulação de colírios, com o objetivo de fazer a marcação de lesões oculares (PEREIRA, 2003; SCHAFER et. al, 2000). A literatura também reporta o uso do corante na inativação de microrganismos em diversos contextos (SCHAFER et. al, 2000).

**Figura 4:** Representação química corante xantênico Rosa de Bengala (RB).



Fonte: (PERUSSI, 2007)

Comercialmente, RB é encontrada como sal dissódico e apresenta propriedades interessantes para o uso como fotossensibilizador tais como: elevado coeficiente de absorvidade molar, elevado rendimento quântico do estado tripleto, elevado rendimento na supressão do estado tripleto pelo oxigênio molecular. Assim, o RB trata-se do corante com o maior rendimento quântico de oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) dentre os xantenos tradicionais. Seu mecanismo fotodinâmico consiste na formação de 80% de oxigênio singlete e 20% de ânion superóxido com absorção de luz na faixa de 450-600 nm (PERUSSI, 2007; PEREIRA, 2003). Além disso, apresenta baixa taxa de fotobranqueamento (degradação na presença de luz) em solventes polares próticos. Contudo, a molécula apresenta um caráter hidrofílico alto, o que diminui consideravelmente a sua interação com membranas biológicas, que devido a sua natureza lipídica tem maior afinidade com compostos mais hidrofóbicos, salvo os efeitos de

carga em fosfolipídios aniônicos, onde as forças eletrostáticas modulam a interação droga-membrana (PERUSSI, 2007; PEREIRA, 2003; SCHAFER et. al, 2000).

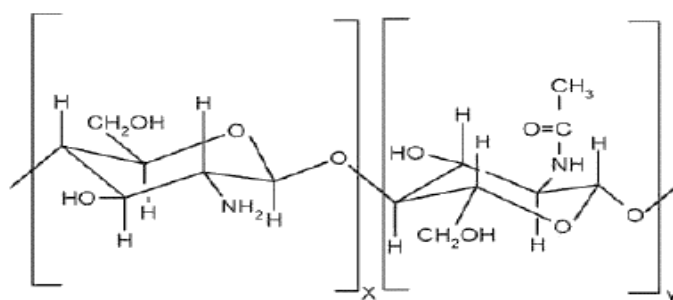
## 1.4 QUITOSANA

O uso de polímeros naturais para aplicações diversificadas tem sido de vital importância para os avanços das ciências e apresentam várias vantagens como ser de fácil obtenção, ser biocompatível e biodegradável. Os polissacarídeos, como uma classe de macromoléculas naturais, têm sua propensão extremamente bioativa, e são geralmente derivados de produtos agrícolas ou de crustáceos (AZEVEDO, et. al, 2007).

Quitina e quitosana são polímeros atóxicos, biodegradáveis, biocompatíveis e produzidos por fontes naturais renováveis, cujas propriedades vêm sendo exploradas em aplicações industriais e tecnológicas há quase setenta anos. Ambas as estruturas são constituídas por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-Dglicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$  entretanto os polímeros diferem quanto à proporção relativa dessas unidades e quanto à solubilidade. (AZEVEDO, et. al, 2007).

A quitosana é um derivado *N*-desacetilado da quitina. Um biopolímero é considerado uma quitosana quando a quitina é *N*-desacetilada a ponto de se tornar solúvel em uma solução diluída de ácido, que geralmente ocorre na proporção da ordem de 40-60%. A proporção de resíduos glicosamina e *N*-acetilglicosamina na quitina e quitosana é chamado de grau de acetilação GA, e este possui significativa influência na propriedades desses biopolímeros. (FRANCA, 2009)

**Figura 5:** Esquema da estrutura polimérica da cadeia quitina (y) - quitosana (x). A Quitina é a acetilglicosamina (1-4) -ligada 2-acetamido-2-deoxi-  $\beta$ -D-glican e a quitosana é a glicosamina (1-4) -ligada 2-amina-2-deoxi- $\beta$ -Dglican. Quitosana são tipicamente formadas por várias razões y:x, onde  $y \leq x$ .



Fonte: (FRANCA, 2009).

A quitosana, ao contrário da quitina, é positivamente carregada em condições ácidas e neutras, e portanto, a capacidade de adsorção é dependente do pH e do grau de acetilação. (FRANCA,2009). Devido à grande disponibilidade da quitina e da quitosana e da grande afinidade das mesmas com íons, moléculas, macromoléculas e até com microrganismos, uma grande variedade de nanopartículas de quitosana são modificadas para realizar variados tipos de aplicações: na remoção de metais pesados, na recuperação de metais preciosos, na fertilização agrícola, na remoção de pesticidas, como flocculante no tratamento de águas, na prevenção de doenças causadas por fungos e bactérias, como carregador de fármacos, cápsulas de medicamentos, e como regulador de colesterol no plasma sanguíneo e triglicérides intestinais no corpo humano. (AZEVEDO, et. al, 2007; FRANCA, 2009).

### 1.5 *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Em se tratando de biologia, podemos observar grande similaridade entre os organismos, porém alguns seres apresentam características peculiares que os fazem apropriados para os estudos em laboratório, sendo então chamados de organismos modelo. A levedura *Saccharomyces Cerevisiae* é um modelo microbiológico unicelular eucariótico muito utilizado em pesquisa das ciências Biológicas e Biomédicas, por apresentar características celulares muito semelhantes às de células humanas (SILVA et. al, 2009).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é usada como organismo modelo para estudo de vários fenômenos biológicos como envelhecimento, regulação da expressão gênica, transdução de sinal, distúrbios neurodegenerativos, assim como, ciclo e morte celular através da apoptose (Karathia et al., 2011). No entanto, foi através de estudos do seu metabolismo que encontraram-se semelhanças em relação ao metabolismo de células tumorais. Isto propiciou considerar esta levedura um modelo metabólico favorável para o rastreamento de alvos de drogas para aplicações em terapias anticâncer (Diaz-Ruiz et al., 2011).

O tumor é caracterizado como um crescimento anormal de células, podendo ser benigno ou maligno, este último resulta no câncer. Para sua proliferação e progressão, as células tumorais necessitam de grandes quantidades de energia. A glicose é a principal fonte desta energia, assim como de metabólitos para inúmeros processos (Escoté & Fajas, 2015). Desse modo, células tumorais são caracterizadas pela desenvolvida via glicolítica que normalmente ocorre na ausência de oxigênio mas pode ser realizada na sua presença em um

processo conhecido como “efeito Warburg” (Lu & Cai, 2015). Isso permite que as células de tumor possam adaptar seu metabolismo de acordo com as condições à que estão submetidas através de um segundo fenômeno denominado “efeito Crabtree” que caracteriza-se por esta capacidade de realizar mudanças reversíveis em suas condições metabólicas (Diaz-Ruiz et al., 2011).

Do mesmo modo, a levedura *Saccharomyces Cerevisiae* possui estes dois efeitos havendo eficientes mecanismos de adaptação para manutenção da sua alta taxa de crescimento, podendo auto regular a expressão de seus genes de acordo com o regime nutricional em que se encontra. Sendo assim, quando o suprimento de glicose é elevado, a levedura utiliza a fermentação como sua principal via metabólica e quando esta fonte de carbono é escassa, ela pode alternar para o metabolismo oxidativos, invertendo o processo.

O metabolismo energético das células tumorais é semelhante, alternando suas vias metabólicas de acordo com as variações do microambiente biológico (Diaz-Ruiz et al., 2011). Inclusive há fotossensibilizadores utilizados especificamente para matar células cancerígenas que têm sido efetivos na morte de células fúngicas.

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação dos efeitos da adsorção de corante Rosa de Bengala em superfície do biopolímero quitosana, através de diálise, no processo de ação de fotoinativação de microrganismos *Saccharomyces cerevisiae*.

Caracterizar os resultados através de espectroscopia na região do UV-vis e imagens microscópicas digitais.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos foram desenvolvidos nos laboratórios do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQ-UFU). Todos os materiais reutilizáveis foram lavados e secos, posteriormente imersos em solução alcoólica 70%, expostos à luz UV em tempos determinados, e então esterilizados com auxílio da autoclave. Sendo desembalados após desinfecção apenas ao momento de realização dos métodos experimentais, depois de mantidos em secagem a estufa a 56°C.

#### 3.1 MATERIAIS

ÁGUA DESTILADA

ÁGAR SABOROUND

AUTOCLAVE

CORANTE ROSA DE BENGALA

CLORETO DE SÓDIO (NaCl)

MICROORGANISMOS *Saccharomyces Cerevisiae*

SISTEMA DE IRRADIAÇÃO LED

SOLUÇÃO SALINA 0,9%

SOLUÇÃO ÁCIDO ACÉTICO (1%)

MICROSCÓPIO

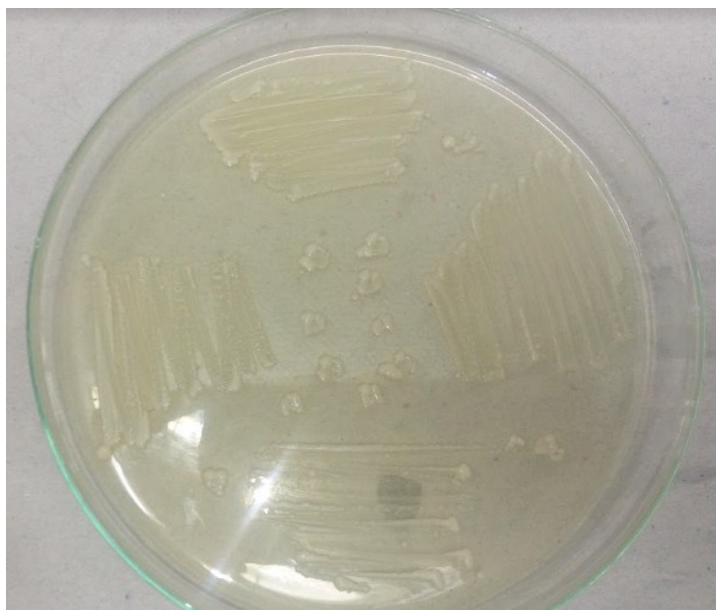
ESTUFA

#### 3.2 MÉTODOS

##### 3.2.1 PREPARAÇÃO DA CULTURA MICROBIOLÓGICA

Para preparação das culturas foram utilizadas cepas da levedura *Saccharomyces Cerevisiae*, cultivadas em Ágar Saboround, preparado pela mistura de 5 gramas de peptona, 40 gramas de glicose, 20 gramas de ágar Saboround e 1000 mL de água destilada. As leveduras foram inoculadas através de esfregação sobre ágar disposto em placas de Petri, posteriormente estocadas em recipientes devidamente esterilizados e com umidade suficiente às necessidades do microrganismo, por 48 horas em estufa a uma temperatura de 37° C.

**Figura 6:** Expansão cepas da levedura *Saccharomyces Cerevisiae*



FONTE: AUTORA.

### **3.2.2 AVALIAÇÃO DO SOLVENTE APROPRIADO AO PROCESSO DE FOTOINATIVAÇÃO MICROBIOLÓGICA**

Para determinar qual meio melhor se adequaria a solução de corante para testes de fotoinativação microbiológica, foi analisado o comportamento das células mediante o meio salino ou meio aquoso. Foram feitos esfregaços em lâminas da suspensão microbiológica e as mesmas foram colocadas em placas de Petri e imersas em solução de corante, previamente preparada em meios aquosos e salinos, e deixadas em repouso por 40 minutos. Após esse tempo determinado, as lâminas foram dispostas na estufa por 24 horas para secagem, sendo então realizada a observação microscópica da coloração e integridade das leveduras.

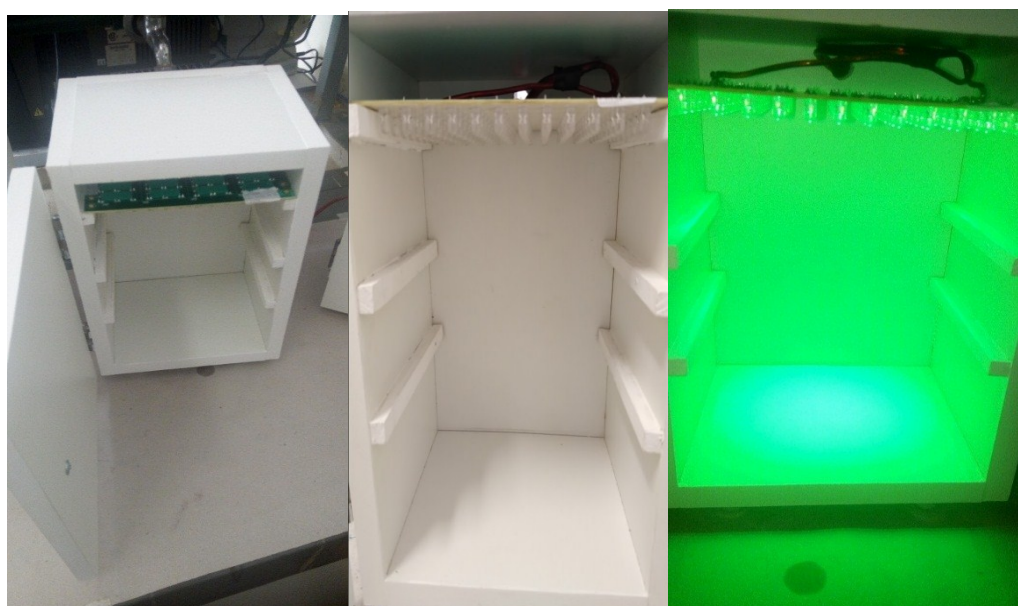
### **3.2.3 AVALIAÇÃO FOTOFÍSICA**

Os estudos para avaliação das propriedades fotofísicas foram realizados através de espectroscopia óptica: absorção eletrônica UV-Vis. As medidas de absorção eletrônica UV-Vis foram realizadas em espectrofotômetro, cedido pelo Laboratório de Analítica do IQUFU. Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente em solução aquosa e em solução salina, operando na faixa de 200-800 nm.

### 3.2.4 AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE IRRADIAÇÃO

Como fonte de irradiação foi utilizado um sistema estático empregando uma cabine de iluminação composta por uma série de 96 LEDs, como mostra a figura 7, desenvolvida pelo Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira. Para produção do sistema utilizou-se de placas de MDF, placa composta por 96 LEDs, e fonte de 12 V, com alimentação de 220W. O sistema de LED verde com emissão (495–570 nm), está dentro do comprimento máximo de absorção do corante analise (em torno de 550 nm).

**Figura 7:** Foto ilustrativa do sistema de irradiação de LED verde.



Fonte: AUTORA.

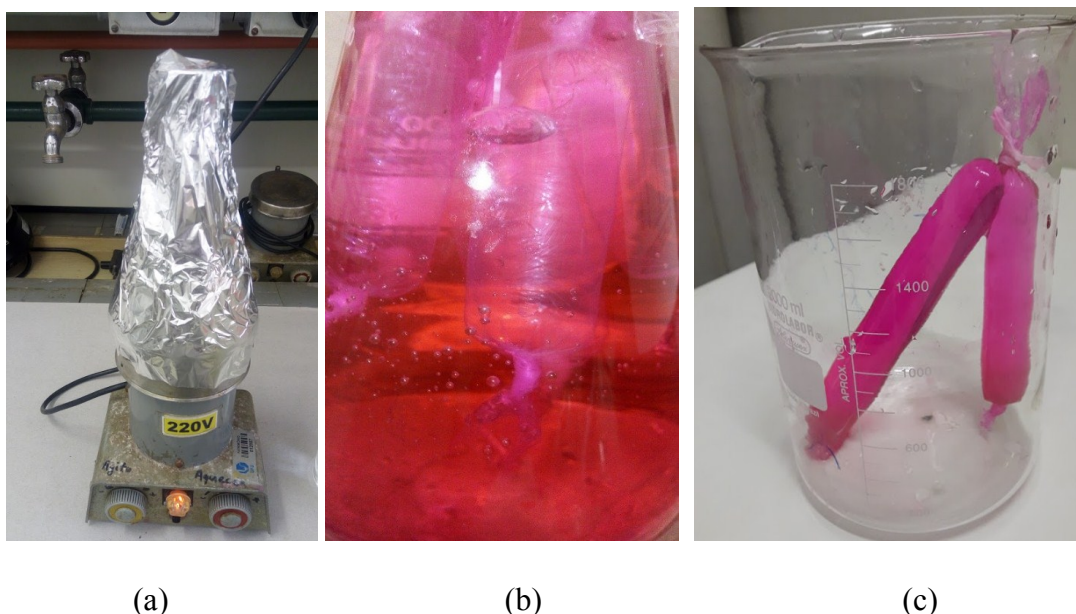
### 3.2.5 AVALIAÇÃO DE FOTOINATIVAÇÃO MICROBILÓGICA

#### 3.2.5.1 PRODUÇÃO DO COMPÓSITO QUITOSANA/ CORANTE ROSA DE BENGALA

O compósito foi produzido pelo método de diálise (desenvolvido no Labiofot), utilizando-se de quitosana (ALDRICH, com baixo peso molecular 50.000 a 190.000 Da) 0,1%, dissolvida em ácido acético 0,1%. A solução foi disposta em sacos de diálise imersos em solução de Rosa de Bengala 50  $\mu$ M, estando em sistema de baixa agitação por tempos determinados de 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2; 3; 4; 24 e 48 horas. Posteriormente, os sacos de diálises foram

deixados imersos em repouso em água destilada, para remoção do corante não ligado a quitosana. A seguir, foram realizadas leituras de absorbância por espectrofotometria e medidas de concentração de fotossensibilizador em cada uma das análises em seus determinados tempos.

**Figura 8:** Sistema de diálise de produção de compósito Rosa de Bengala/Quitosana. (a) Sistema de diálise isento de luminosidade sobre chapa com agitação (b) Sacos de dialise com quitosana submersos em solução de corante (c) Saco com solução de compósito após processo de diálise.



Fonte: AUTORA.

### 3.2.5.2 ENSAIOS DE FOTOINATIVAÇÃO

Os ensaios foram realizados através de quantificação de Unidades formadoras de colônias (UFC's) de *Saccharomyces Cerevisiae*. Foram utilizados 1500  $\mu\text{L}$  do inoculo na escala nefalométrica de Mc Farland 0,5, padrão utilizado para obtenção da concentração de células em suspensão através da turbidez. Um volume de 1500  $\mu\text{L}$  da solução de corante previamente preparada foi adicionado nas concentrações de 100, 50, e 25  $\mu\text{M}$ . Nos experimentos controles, adicionou-se 1500  $\mu\text{L}$  de água.

O preparo do inóculo e fotossensibilizador foi então deixado previamente em um tempo de 20 minutos de incubação (no escuro), posteriormente vindo a ser exposto a radiação em equipamento de LED na cor verde durante 20 minutos. Após a irradiação, 100  $\mu\text{L}$  da suspensão

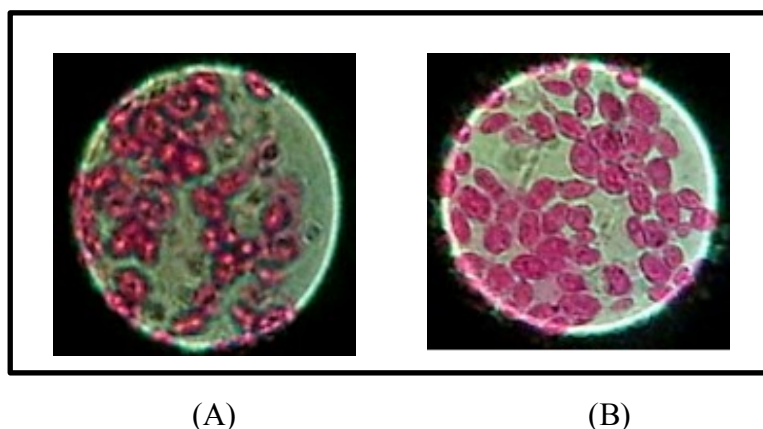
celular foram diluídos em série de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ . De cada diluição foram retirados 20 microlitros que foram colocados em respectivas placas de 6 poços já cobertas com Ágar Sabouround Dextrose para posterior quantificação através da contagem de células viáveis formadoras de colônias.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 AVALIAÇÃO DO SOLVENTE APROPRIADO AO PROCESSO DE FOTOINATIVAÇÃO MICROBIOLÓGICA

As células da levedura *Saccharomyces Cerevisiae* possuem uma forma característica, como mostra a figura 9 (A). Após o procedimento descrito anteriormente foram obtidas imagens microscópicas das lâminas, dispostas na figura 9. Desta forma em comparação a figura 9 (A) é possível a percepção de qual meio, aquoso ou salino, causa menos danos a estrutura da levedura.

**Figura 9:** Imagens microscópicas da levedura *Saccharomyces Cerevisiae*. (A) Células após tratamento em solução aquosa de RB (B) Células após tratamento em solução salina de RB.



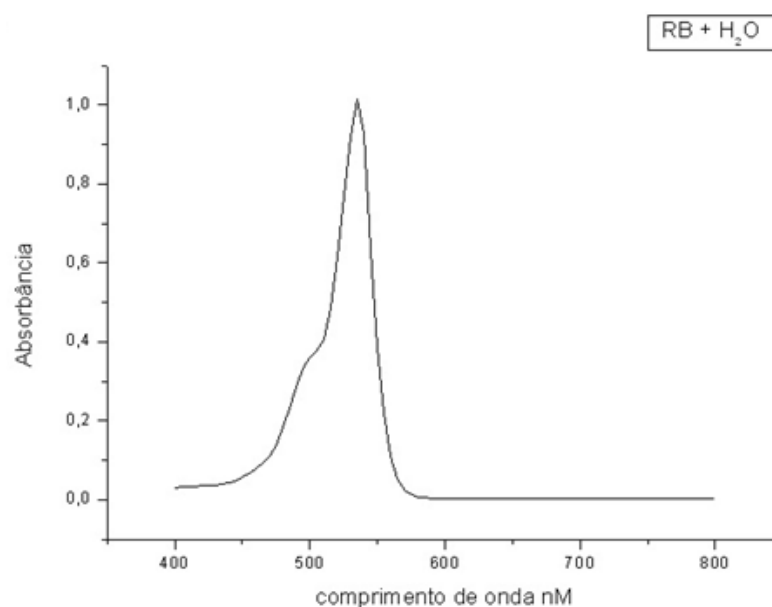
FONTE: (Adaptado ARAPIRACA, 2011; AUTORA)

Avaliando a figura 9 observa-se que o meio salino mostrou-se mais eficaz para utilização do processo de fotoinativação, uma vez que o mesmo manteve a integridade morfológica da levedura, diferentemente do meio aquoso que, como pode ser observado na figura 9 (A), apresentou células defeituosas depois do processo de contato com a solução de corante, tal processo pode estar ligado ao estresse hídrico gerado pelo excesso de água à célula. Assim, todos os testes seguiram-se com soluções de corante Rosa de Bengala em meio salino.

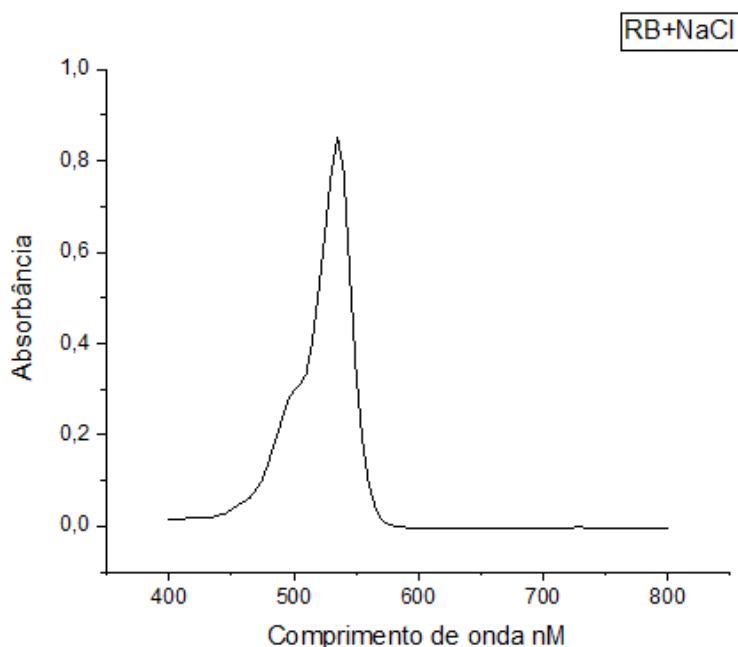
## 4.2 AVALIAÇÃO FOTOFÍSICA: ESPECTROS DE ABSORÇÃO

Os espectros de absorção de soluções homogêneas de fotossensibilizadores básicos ou catiônicos apresentam características fortemente dependentes da concentração. Foram feitas varreduras dos espectros de absorção do corante em solução aquosa e em solução salina, os resultados estão dispostos na figura 10.

**Figura 10:** Espectros de absorção do corante Rosa de Bengala (RB) (a) em meio aquoso, (b) em meio salino



(a)



(b)

Fonte: AUTORA.

Em todos os espectros em análise o corante apresenta duas bandas de absorção mais significativas, sendo a banda de maior absorção em 550 nm, característica do pico de máxima absorção do corante. A primeira banda em torno de 500 nm em meio aquoso e em meio salino apresenta uma absorbância em torno de 0,3.

Esta banda de absorção em torno de 500 nm em todos os espectros pode estar ligada ao processo de dimerização do corante. Dimerização é o processo pelo qual duas moléculas (monômeros) se ligam formando um conjunto denominado *dímero*. Se houver a união de três moléculas o conjunto passa a ser chamado de *trímero*, e se ocorrer a união de maior número de moléculas, será formado um *polímero*. Em geral atribui-se ao agregado a forma dimérica. A agregação reduz drasticamente a capacidade do composto de gerar oxigênio singlete, desse modo é necessário que o princípio fotoativo apresente-se solubilizado e na forma monomérica (MOSER, 1998).

As constantes de equilíbrio de dimerização podem chegar a ser da ordem de até  $10^4$ , o que faz com que muitos corantes apresentem o equilíbrio deslocado no sentido da formação de agregados, mesmo em baixas concentrações (em torno de  $10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>). As constantes de

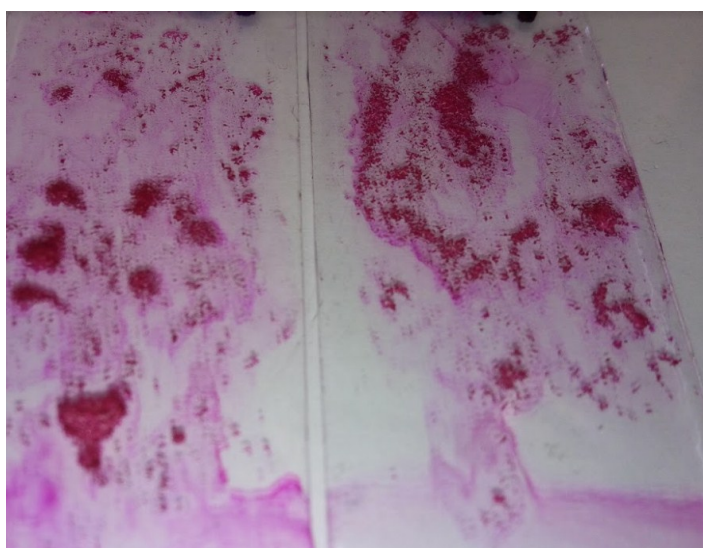
agregação dependem do solvente, da temperatura e da força iônica do meio. Os espectros eletrônicos destes agregados são diferentes dos corantes na forma monomérica (ALVES,2011).

A agregação de corantes iônicos não pode ser atribuída a um tipo específico de interação. Existe a contribuição de efeitos devidos a forças do tipo Van der Waals, ligações de hidrogênio intermoleculares e interações de elétrons  $\pi$ , sendo na maioria das vezes difícil avaliar a contribuição individual de cada uma dessas interações. (ALVES,2011).

As interações entre as moléculas do corante geram níveis eletrônicos com energias diferentes. As regras de transição entre esses novos níveis resultam em modificações nos espectros de absorção, com o aparecimento de novas bandas em comprimentos de onda diferentes. Dependendo da geometria dos agregados são permitidas transições com energias maiores ou menores que as transições presentes no corante na forma monomérica. Este fenômeno, é chamado de metacromasia. (ALVES,2011).

Para comprovação de metacromasia do corante, foi-se depositado sobre uma lâmina um filme bem fino de biopolímero quitosana, e sobre o mesmo foi colocada uma solução de alta concentração do corante e deixado em repouso para que visualmente fosse observado uma mudança de coloração.

**Figura 11:** Lâminas revestida com quitosana e solução de RB de alta concentração para análise de metacromasia:



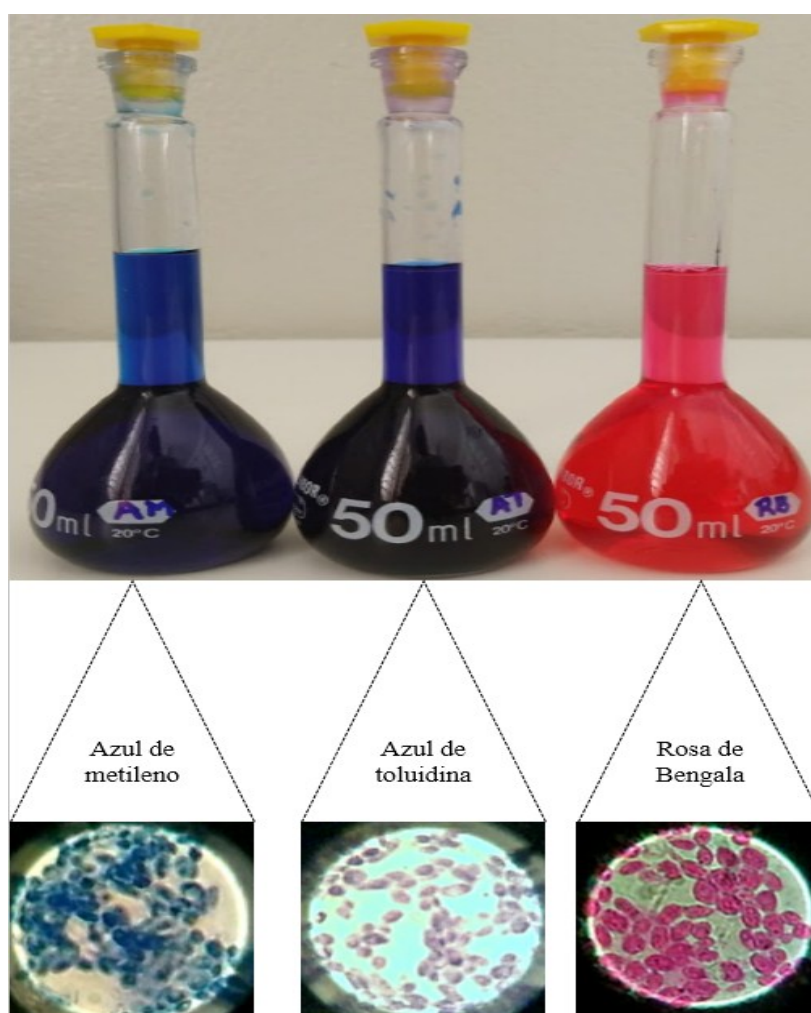
Fonte: AUTORA.

Pela análise da figura 11, observa-se que a interação entre corante e biopolímero não apresenta estado de metacromasia, de forma que o corante apresenta a mesma coloração antes e após a interação.

A metacromasia é advinda do processo de agregação, desta forma a adsorção do corante a superfície do biopolímero não foi enérgica de forma que houvesse espaçamentos para auto agregação do corante a ponto de que a mesma fosse mais favorável que a adsorção corante-quitosana. Esse processo é importante, a ponto de afetar a cor e propriedades fotofísicas, gerando mudanças nos espectros dos fotossensibilizadores (Vara & Ortiz, 2016).

Outros dois fotossensibilizadores que têm sido estudados para erradicação de microrganismos, são os fenotiazínicos Azul de Toluidina (AT) e Azul de metileno (AM). Corantes fenotiazínicos apresentam processo de metacromasia, sendo este processo mais evidente ao corante azul de toluidina. Na figura 12, observa-se cepas de *Saccharomyces Cerevisiae* após coloração com os corantes Rosa de Bengala, Azul de Toluidina e Azul de Metileno.

**Figura 12:** Imagens microscópicas de Coloração do *Saccharomyces Cerevisiae* promovida pelos corantes Azul de Metileno, Azul de Toluidina e Rosa de Bengala.



Fonte: AUTORA.

Após coloração, o azul de toluidina inicialmente com coloração azul apresenta coloração arroxeada, distando-se de sua cor característica, como o Azul de Metileno e Rosa de Bengala que mantiveram a coloração original característica.

### 4.3 AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE IRRADIAÇÃO

O sistema de irradiação foi construído no laboratório e possui três posições de alturas possíveis para posicionamento das amostras para irradiação, sendo eles, alto, intermediário e baixo, sendo esta última a de maior possibilidade de aproximação das amostras ao LED de irradiação.

Com auxílio de um luxímetro, mediu-se a intensidade luminosa em cada uma das posições de alturas, com a finalidade de saber em quais delas o sistema irradia com maior energia as amostras. Os resultados de intensidade luminosa em Fc (fotocandela) estão dispostos na tabela 2, bem como a conversão dos valores em seus equivalentes valores em iluminância ( $\text{lm.cm}^{-2}$ ), e deste para sua potência em  $\text{Watts.cm}^{-2}$ , sendo assim possível a determinação da energia em  $\text{J.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$  recebida pela irradiação luminosa do LED em cada uma das posições, para determinar qual a posição com maior energia irradiada.

**Tabela 2:** Valores de intensidade luminosa de acordo com posições do sistema de irradiação.

| Posições             | Fc (x 20.000) |     |     | Média     | Iluminância<br>( $\text{lm.cm}^{-2}$ ) | Watts. $\text{cm}^{-2}$ |
|----------------------|---------------|-----|-----|-----------|----------------------------------------|-------------------------|
| <b>Alta</b>          | 149           | 175 | 186 | 340.000   | 365,97                                 | 0,5358272327965         |
| <b>Intermediária</b> | 219           | 224 | 243 | 4.572.000 | 4.921,26                               | 7,205358711567          |
| <b>Baixa</b>         | 249           | 273 | -   | 5.220.000 | 5.618,76                               | 8,226588579795          |

Fonte: AUTORA.

Com a potência em  $\text{Watts.cm}^{-2}$  de cada umas das posições calculou-se a energia em Joule, de cada uma delas, como disposto a tabela 3.

**Tabela 3:** Energia para cada posição do sistema de irradiação

| <b>Posição</b>       | <b>Energia (J. s<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>)</b> |
|----------------------|---------------------------------------------------|
| <b>Alta</b>          | 5,358.10 <sup>4</sup>                             |
| <b>Intermediária</b> | 7,2053.10 <sup>4</sup>                            |
| <b>Baixa</b>         | 8,2265.10 <sup>4</sup>                            |

Fonte: AUTORA

Diante dos dados obtidos, conclui-se que a posição na qual se incide maior energia luminosa é a de posição mais baixa dentro do sistema de irradiação. Após cálculos da intensidade de energia os testes foram realizados posicionando-se as amostras na mais baixa posição do sistema, posição esta onde ocorre menor espalhamento de luz incidente. As amostras foram expostas a irradiação, nesta posição durante os 1200 segundos, que é o tempo de irradiação descrito na metodologia de ensaios de fotoinativação.

#### 4.4 PRODUÇÃO DE COMPÓSITO QUITOSANA/ CORANTE ROSA DE BENGALA

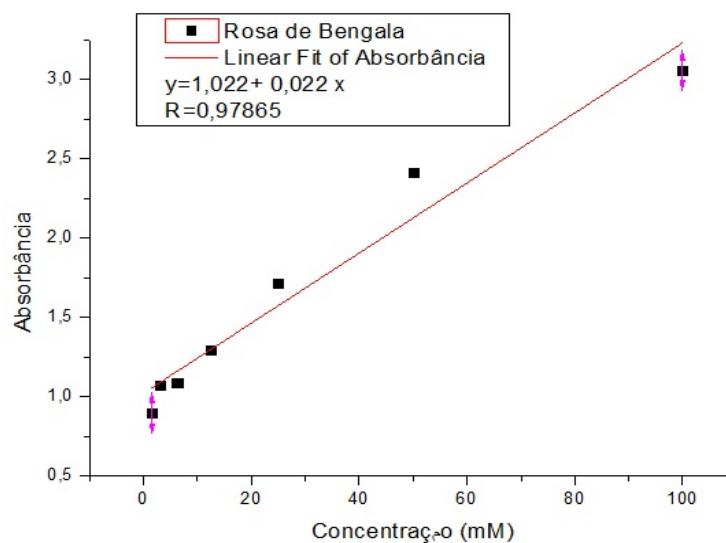
Inicialmente foi-se construído uma curva de calibração a fim de calcular a concentração de corante RB nos compósitos produzidos. Os resultados obtidos estão dispostos na tabela 4 e plotados graficamente na figura 13.

**Tabela 4:** Dados de concentração e absorbância curva de calibração do corante Rosa de Bengala.

| <b>Concentração µM</b> | <b>Absorbância</b> |
|------------------------|--------------------|
| 100                    | 3,1                |
| 50                     | 2,82               |
| 25                     | 1,71               |
| 12,5                   | 1,297              |
| 6,25                   | 1,1595             |

Fonte: AUTORA

**Figura 13:** Gráfico de concentração por absorvância para curva de calibração do corante Rosa de Bengala.



Fonte: AUTORA.

A partir da equação, obtida pela curva de calibração, foram calculadas as concentrações de RB nos compósitos em diferentes períodos de diálise, como mostra a tabela 5, a fim de determinar qual o melhor tempo para produção do compósito.

**Tabela 5:** Dados de concentração por tempo do compósito RB na concentração inicial de 50  $\mu\text{M}$  em quitosana.

| Tempo (horas) | Absorvância (máx.) | Concentração $\mu\text{M}$ |
|---------------|--------------------|----------------------------|
| 1             | 1,994              | 44,181                     |
| 2             | 1,993              | 44,136                     |
| 3             | 1,987              | 43,863                     |
| 4             | 1,986              | 43,818                     |
| 24            | 1,939              | 41,6818                    |
| 48            | 1,921              | 40,863                     |

Fonte: AUTORA

Analisando os dados de concentrações obtidos, o melhor tempo para produção foi de 1 hora, pois neste tempo de produção o compósito tem uma maior concentração de corante Rosa

de Bengala em sua composição, sendo então de interesse trabalhar com a maior concentração possível de corante agregado a biomolécula através do processo de diálise.

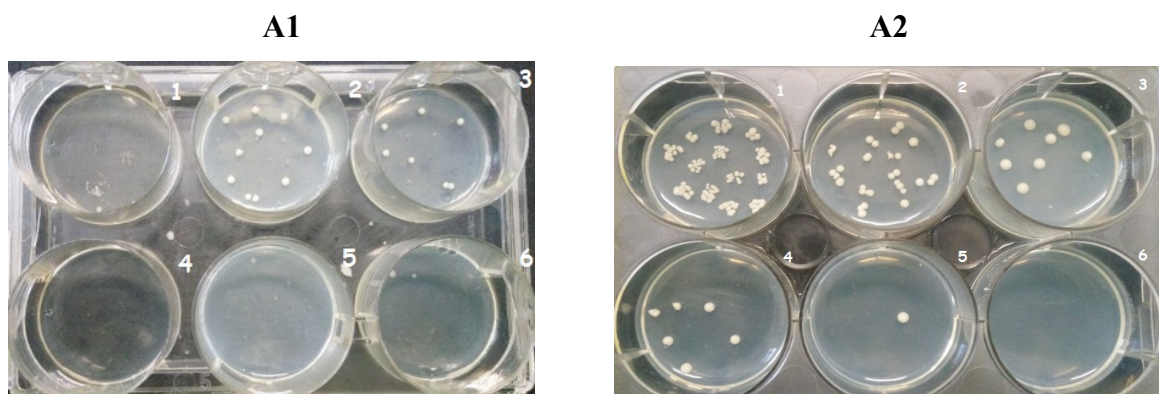
#### 4.5 AVALIAÇÃO DA FOTOINATIVAÇÃO MICROBIOLÓGICA

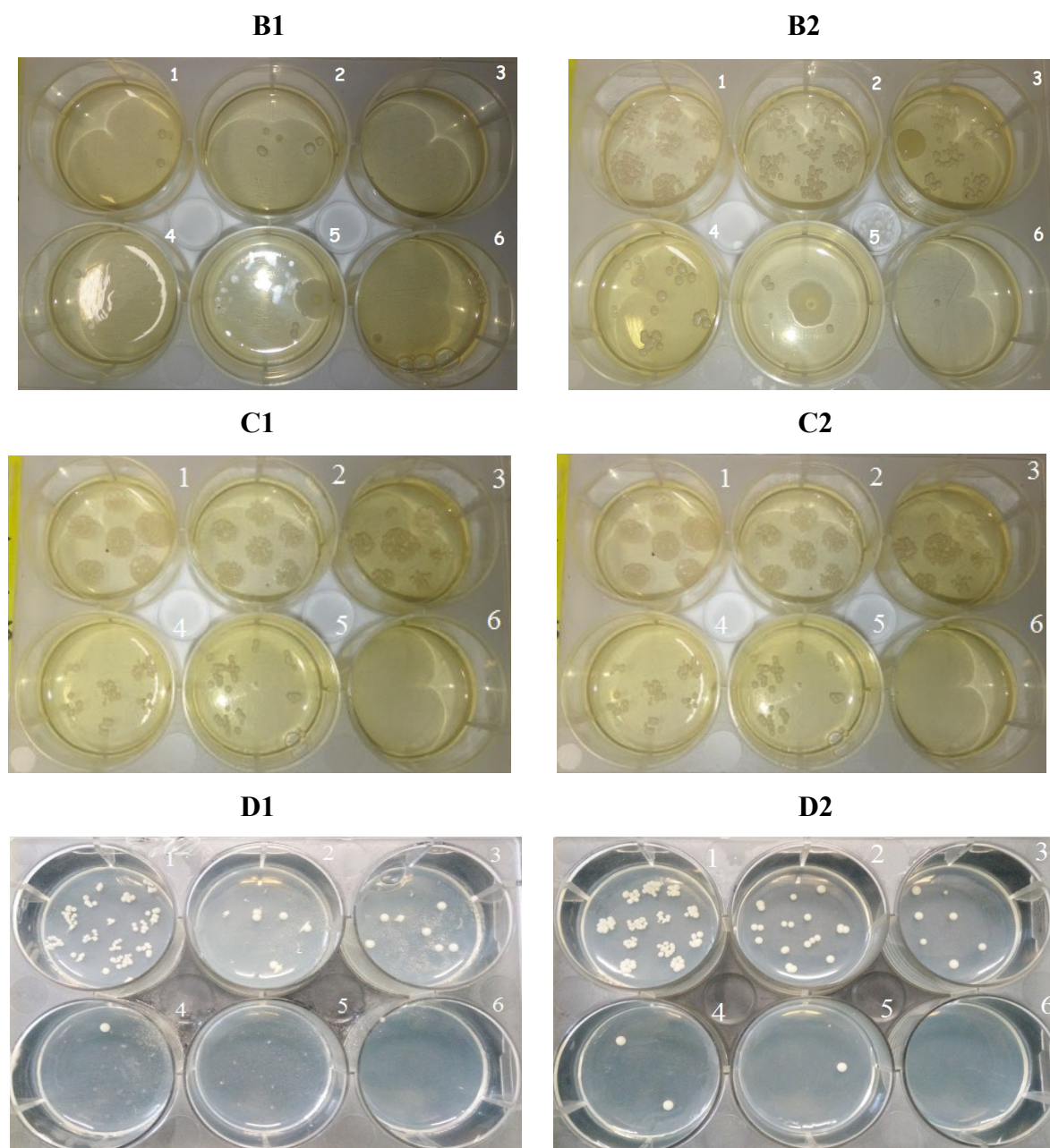
A metodologia utilizada para estimar a quantidade de UFC's foi baseada no trabalho de THOMAS; SEKHAR, et. al, 2015 que sugeriu um método denominado single plate-serial dillution spotting (SP-SDS) válido para bactérias e fungos, e que permite a acomodação de múltiplas diluições em uma única placa de Petri.

Testes anteriores utilizando as técnicas clássicas de espalhamento em superfície (spread-plate) e plaqueamento em profundidade (pour-plate) demonstraram propensão a prejudicar as células ou até mesmo aprisionamento da célula no meio ágar a qual seria dispersa (THOMAS; SEKHAR, et. al, 2015).

O SP-SDS é um método que permite o uso de diferentes diluições com auxílio de pipetas para realizar a deposição das células sobre o meio de crescimento utilizado, Ágar Saboround. A utilização de uma placa de 6 poços, foi adaptada ao método para que houvesse ainda mais dinâmica na realização dos testes, além de evitar que as gotas de diferentes diluições se misturem durante o crescimento das UFC's.

**Figura 14:** Viabilidade celular método SP-SDS de colônias de *Saccharomyces Cerevisiae* utilizando-se de corante Rosa de Bengala nas concentrações de 50, 25, e 12,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente as letras A, B e C, grupo controle pertencentes as figuras de letra D, número 1 refere-se aos testes em presença de luz, e número 2 aos testes em ausência de luz, em várias diluições seriadas ( $n^{\circ} 1 = 10^{-1}$ ;  $n^{\circ} 2 = 10^{-2}$ ;  $n^{\circ} 3 = 10^{-2(1/2)}$ ;  $n^{\circ} 4 = 10^{-4}$ ;  $n^{\circ} 5 = 10^{-5}$  e  $n^{\circ} 6 = 10^{-6}$ ).





Fonte: AUTORA

A leitura das placas foi realizada pela contagem padrão de colônias de *Saccharomyces Cerevisiae* (Unidade Formadora de Colônias - UFC/mL) com o auxílio de um contador de colônias. Para cada diluição ( $10^{-1}$  à  $10^{-4}$ ), os resultados do número de colônias foram obtidos pela média aritmética dos resultados das placas em triplicata, multiplicada pela diluição correspondente (10, 100 ou 1000).

O resultado de cada grupo foi encontrado por meio da média aritmética das três placas. Em seguida, para obter o número de UFC por mL, converteu-se resultado de cada grupo a partir

da quantidade inoculada de 20  $\mu\text{L}$  para 1 mL, dividindo o resultado por 0,020, obtendo o resultado final de UFC's.mL<sup>-1</sup> em potência de 10, equações 1 à 3.

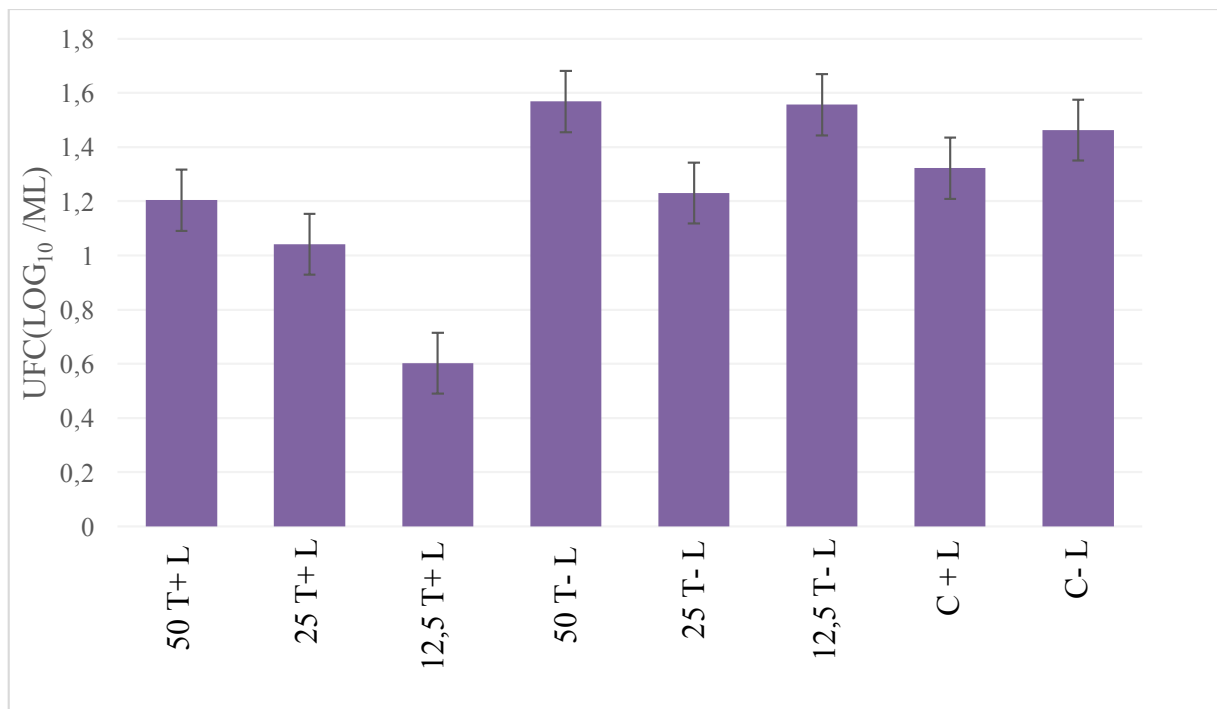
$$\text{N}^\circ \text{ de UFC de cada grupo} = \frac{\text{N}^\circ \text{ UFC's placa 1} + \text{N}^\circ \text{ UFC's placa 2} + \text{N}^\circ \text{ UFC's placa 3}}{3} \quad (1)$$

$$\text{N}^\circ \text{ de UFC.mL}^{-1} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de UFC de cada grupo}}{0,020} \quad (2)$$

$$\log_{10} \text{N}^\circ \text{ de UFC.mL}^{-1} = \text{UFCUFC.mL}^{-1} \text{ em contagem logarítmica.} \quad (3)$$

Para analisar a contagem de UFC.L<sup>-1</sup> de *Saccharomyces Cerevisiae*, optou-se por transformar os valores em potência de 10, utilizando-se o logarítmico decimal deste número para a análise estatística.

**Figura 15:** Gráfico de contagem de UFC's viáveis após teste de avaliação de fotoinativação microbiológica.



Fonte: AUTORA

A figura 15 apresenta os valores das médias e desvios padrões em UFC(log10). L<sup>-1</sup> obtidas para os testes em cada uma das concentrações usadas durante o experimento, em comparativo a contagem dos grupos controles.

A análise gráfica de contagem de UFC's após fotoinativação, mostra que em comparação ao experimento controle em presença de luz, houve uma queda de 0,7 para a concentração de 12,5 µM, e na concentração de 50 µM houve queda de 0,1 em relação ao grupo de controle. A menor concentração de RB foi melhor para inibição do crescimento celular. De maneira geral espera-se que uma maior quantidade de fotossensibilizador promova uma maior morte celular, porem essa correlação não foi estabelecida nos resultados.

Este efeito pode estar relacionado ao processo de agregação já discutido anteriormente, demonstrando que quanto mais elevada a concentração do corante RB, mais interação entre as moléculas do mesmo, com maiores possibilidades de agregação.

A inexistência de metacromasia, dispensa a construção de um outro sistema de irradiação, capaz de abranger as bandas de absorção do corante em sua forma monomérica, quanto em sua forma agregada. O processo de metacromasia, pode também interferir de modo direto nos testes de fotoinativação, visto que a metacromasia altera as bandas de absorção do corante (Vara & Ortiz, 2016).

Nos experimentos com RB na ausência de luz, a concentração onde houve maior inibição de crescimento de UFC's foi de 25 µM, mostrando um crescimento em 0,23 unidade log menor ainda que o grupo controle na ausência de luz.

Os experimentos controles, irradiados apresentaram diminuição de apenas 0,1 unidade de UFC's, em relação aos experimentos controles não irradiados evidenciando que o corante não é tóxico no escuro. O efeito fungicida obtido, na ausência de um fotossensibilizador é consequência de uma exposição direta da levedura à luz (Maver-Biscanin et al. (2005). Nossos resultados mostram que as células de *Saccharomyces Cerevisiae* são pouco suscetíveis a ação da radiação por si só.

Tendo o valor de 12,5 µM proporcionado o melhor efeito de fotoinativação pelo corante não agregado a biomolécula, produziu-se o composto, no tempo de uma hora com o corante na concentração de 12,5 µM. Com auxílio da curva de calibração inicialmente preparada foi-se determinado a concentração final de corante presente no composto, os testes realizados em triplicata estão com resultados dispostos a tabela 6.

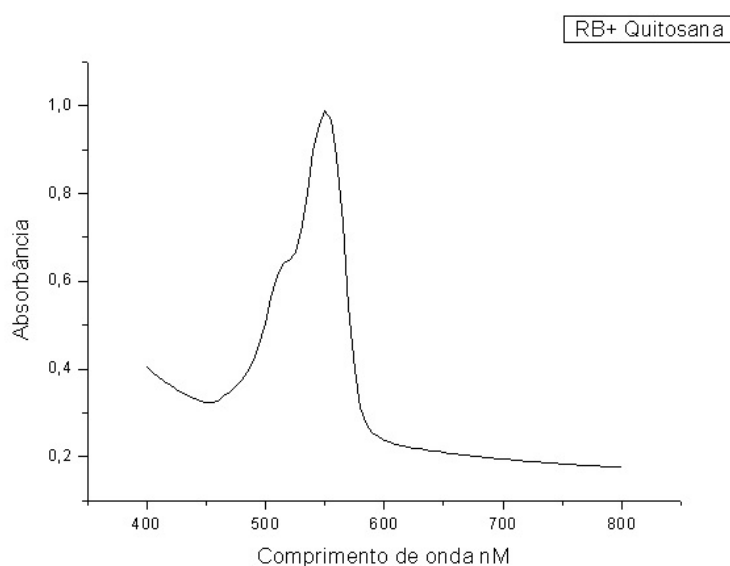
**Tabela 6:** Dados de concentração por tempo do compósito RB na concentração inicial de 12,5  $\mu\text{M}$  em quitosana.

| Compósito | Absorbância (máx.) | Concentração $\mu\text{M}$ | (%) de corante RB adsorvido |
|-----------|--------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 1         | 1,283              | 11,88                      | 95,04                       |
| 2         | 1,282              | 11,86                      | 94,88                       |
| 3         | 1,283              | 11,88                      | 95,04                       |

Fonte: AUTORA

Leitura espectrofotométrica do compósito foi realizada, para análise de possível mudanças espectrais do mesmo, como mostrado na figura 16.

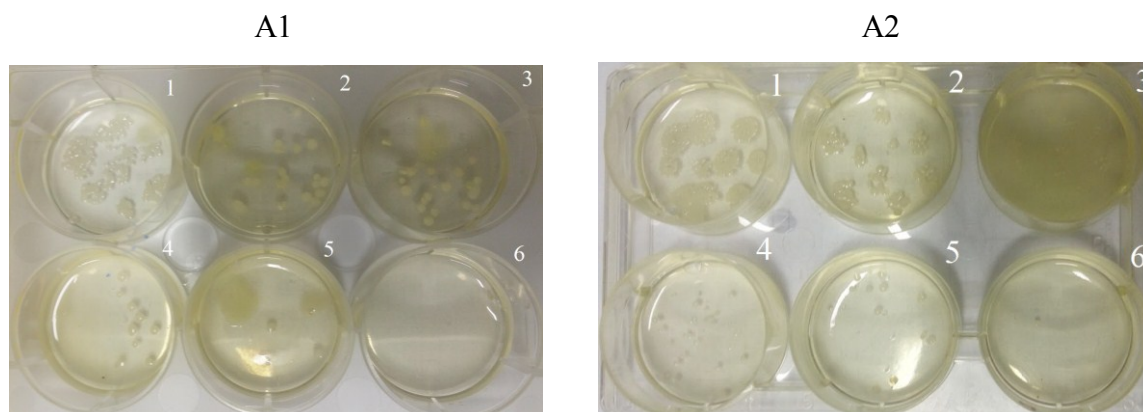
**Figura 16:** Espectro de absorção compósito Rosa de Bengala / Quitosana



Fonte: AUTORA

Observa-se pela figura 16 que, após interação entre corante e polissacarídeo, não houve mudanças nas características espectrais, de forma que as banda máxima de absorção ainda mantiveram-se em 550 nm, bem como a banda secundária ainda permanece em 500 nm, não sendo necessário modificar o sistema de irradiação.

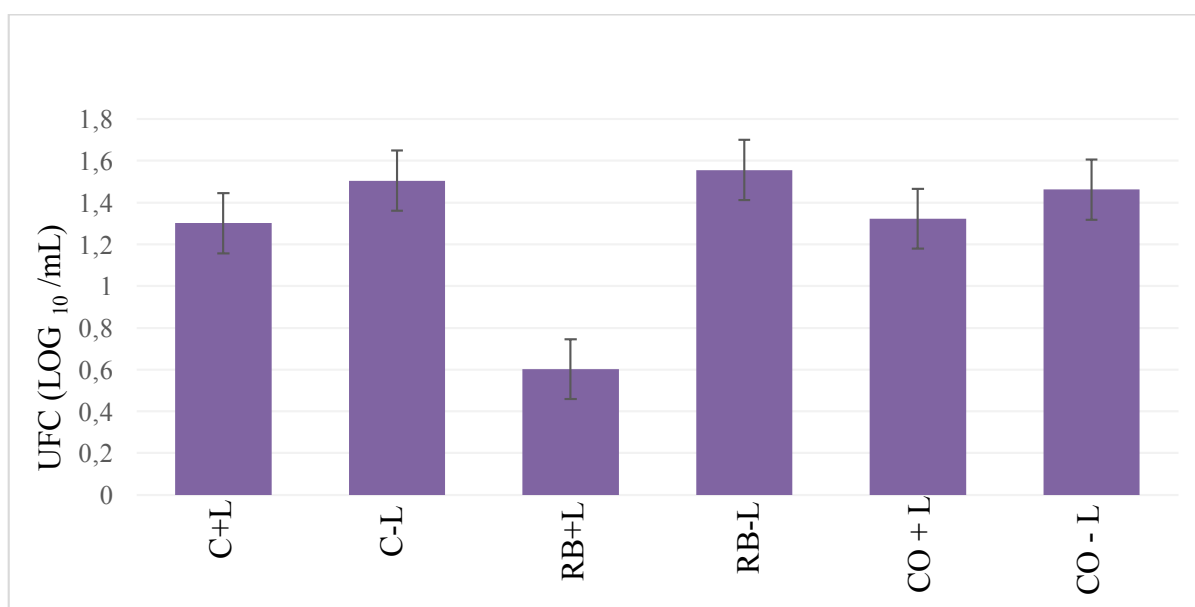
**Figura 17:** Viabilidade celular (método SP-SDS) de colônias de *Saccharomyces Cerevisiae* utilizando-se de compósito Rosa de Bengala/Quitosana nas concentrações de 12,5  $\mu$ M. A1 sem presença de luz e A2 com presença de luz.



Fonte: AUTORA

A contagem de UFC's viáveis foi realizada utilizando da mesma metodologia dos testes para o corante não ligado a quitosana, sendo possível realizar o comparativo das duas formas de fotoinativação, figura 18.

**Figura 18:** Gráfico de contagem de UFC's viáveis após teste de avaliação de fotoinativação microbiológica com compósito com e sem irradiação, respectivamente C+L e C-L, corante não ligado a biomolécula com e sem presença de irradiação, respectivamente RB+L e RB-L, e testes de controle também com e sem radiação, respectivamente CO+L e CO-L. Utilizou-se corante na concentração de 12,5  $\mu$ M.



Fonte: AUTORA.

Os dados da figura 18, mostraram que a incorporação do corante Rosa de Bengala à biomolécula não foi eficiente para inibição de crescimento do microrganismo *Saccharomyces Cerevisiae*, de forma que o número de UFC's viáveis manteve-se quase equiparado ao grupo de testes controle em presença de luz, distando-se em numeração dobrada de crescimento em comparativo ao grupo de testes do fotossensibilizador livre em presença de luz (RB+L).

A forma com que o fotossensibilizador se encontra impregnando ao microrganismo contribui de forma direta a ação do mesmo durante o processo fotodinâmico. A figura 19 está apresentada a imagem microscópica de cepa de *Saccharomyces Cerevisiae* após tratamento de células com compósito.

**Figura 19:** Cepa de *Saccharomyces Cerevisiae* após tratamento com compósito Rosa de Bengala e quitosana.



Fonte: AUTORA.

Na figura 16 verifica-se que após tratamento com compósito os microrganismos não encontram-se corados, comprovando que a carga de fotossensibilizador presente no compósito não foi agregada às células de *Saccharomyces Cerevisiae*.

Além da característica fotossensibilizadora do corante, também o biopolímero possui característica antimicrobiana. A atividade antimicrobiana da quitosana é investigada contra uma ampla gama de microrganismos, em experimentos *in vitro* e *in vivo* e com o polímero em diferentes formas (soluções, filmes, complexos, imobilizada). (BEZERRA, 2011)

São propostos três mecanismos para que ocorra esta ação antimicrobiana: 1) interação iônica entre biopolímero e superfície celular, de forma que forças eletrostáticas entre a molécula e resíduos negativos da superfície da membrana celular promovesse distúrbios capazes de causar danos levando à morte celular. 2) Inibição da síntese de mRNA e proteínas celulares,

ligando-se ao DNA dos microrganismos. 3) Complexação de metais, pela barreira externa de quitosana a membrana celular, assim suprimindo nutrientes necessários aos microrganismos. É provável que os mecanismos ocorram simultaneamente, com diferentes intensidades, depende de todo o meio reacional. (BEZERRA, 2011)

O fotossensibilizador Rosa de Bengala possui um caráter aniônico, contrário ao biopolímero quitosana, com caráter policatiônico advindo dos grupamentos amínicos. Esses grupamentos, uma vez em que são protonados, ligam-se a grupos aniônicos do corante, diferentemente quando o corante está em sua forma livre, que se liga diretamente a parede celular dos microrganismos carregada de cargas positivas. Desta forma quimicamente ligado ao biopolímero o corante torna-se impossibilitado de interagir com a membrana das células alvo, mostrando que a interação corante/quitosana torna-se mais efetiva que a interação parede celular/corante. Assim, nas condições metodológicas empregadas, tanto a ação antimicrobiana do biopolímero, quanto a ação de inativação fotodinâmica do corante, não coexistiram ao tratamento das células da levedura com o compósito.

## 5 CONCLUSÃO

O corante xantênico Rosa de Bengala, possui em sua forma livre citotoxicidade para fotoinativação do microrganismo *Saccharomyces Cerevisiae* em presença de irradiação apropriada, sendo administrado em pequenas doses.

O corante não possui efeito de metacromasia, mesmo com alto poder de agregação, quando colocado a grandes concentrações, esta agregação não é suficiente para que ocorram mudanças às características espectrais do corante.

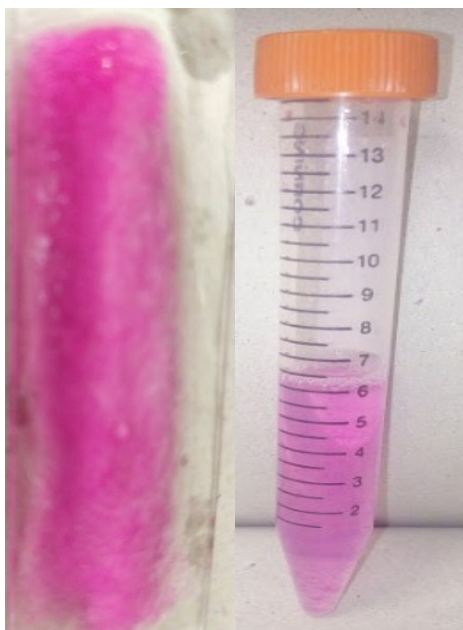
A metodologia de diálise mostrou-se eficaz para produção do compósito, produzido pela adsorção do corante na superfície do polissacarídeo quitosana, porém o mesmo não apresentou inibição de UFC's quantitativamente maior que o corante em sua forma livre.

A interação entre corante e biopolímero, tornou-se mais favorável que a interação dos mesmos com a parede celular da levedura, desfavorecendo o processo fotodinâmico de ação antimicrobiana. Assim a adsorção do corante a parede do biopolímero mostrou-se ineficaz para inibição de crescimentos de UFC's de *Saccharomyces Cerevisiae*.

## 6 TRABALHOS FUTUROS

- Estudos de outras metodologias para adsorção do corante ao biopolímero, utilizando de uma menor porcentagem de biopolímero.
- Estudos da viscosidade da solução de compósito, deixado em repouso após processo de dialise, que foi armazenado em temperatura ambiente e a baixas temperaturas, mostrando aumento de viscosidade as duas situações, figura 20.

**Figura 20:** Solução de corante e quitosana após armazenamento depois do processo de diálise.



Fonte: AUTORA.

- Testar a interação da RB com outras moléculas catiônicas, para serem utilizadas como carreadores da RB as células em teste e aumentar sua eficácia fotodinâmica.
- Melhoria do método de micro diluições seriadas, bem como a contagem de UFC's viáveis, com aumento do volume utilizado, para espalhamento de células no meio ágar Saboround.

## 7 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. C. B. Estudos das propriedades fotofísicas da clorofila cúprica de sódio: influência do solvente, concentração e pH. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de ciências Exatas e Biológicas. Departamento de Física, Ciências Físicas e Materiais. Ouro Preto, 2016.
- ALVES, O. A. “AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO DIODO EMISSOR DE LUZ (LED) EMITINDO EM 60 nm ASSOCIADO À CURCUMINA NA FOTOSSENSIBILIZAÇÃO LETAL DE *Cândida albicans* E DE *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.” ESTUDO “IN VITRO”. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Engenharia Mecânica, Belo Horizonte, 2011.
- ARAPIRACA, A. *Saccharomyces Cerevisiae*. Disponível em: <http://arapiracacefetmg.com.br/2011/09/saccharomyces-cerevisiae-voce-sabe-o.html>, 2011. Acesso em 27 de abril de 2018.
- AZEVEDO, V.V.C; CHAVES, S.A; BEZERRA, D.C; FOOK, M.V.LIA; COSTA, A.C.F. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. Revista Eletrônica de Materiais e Processos (REMAP). Paraíba. Vol.2 Nº3. p.27-34. 2007.
- BEZERRA, A. M. Síntese e avaliações físico-químicas e biológicas de derivados de quitosana de alta e baixa massa molecular. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo (USP). São Paulo. 2011
- ERGAIEG, K; SUEX, R. A comparative study of the photoinactivation os baterias by meso – substituted cationic porphyrin, rose bengal and methylene blue. **Desalination**, v. 246. P. 353-362, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.03.060>
- FRANCA, E. F. Caracterização molecular de biopolímeros em solução utilizando simulação computacional. Dissertação (Doutorado) Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). São Carlos, 2009)
- INDUSTRIAL, Química Inorgânica: Textos de apoio. Ceará. EEEP, Escola Estadual de Educação Profissional, p; 22-24. 2012.
- JORI. G; FABRIS. C; SONCIN. M, FERRO. S, COPPELLOTI. O, DEI D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers Surg Med**. 38(5). p.468-81. 2006. <https://doi.org/10.1002/lsm.20361>

LIMA, A. M. Encapsulação de fotos sensibilizadores em nanopartículas lipídicas solidas para maximização da eficiência fotodinâmica e fototoxicidade. Dissertação de Mestrado em Química Analítica e Inorgânica. Universidade de São Paulo – Instituto de química de São Carlos. São Carlos, 2013.

MACHADO, A. E. H. Terapia Fotodinâmica. Princípios e perspectiva. **Quim. Nova**, Vol. 23. Nº 2, p. 237-243., 2000. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000200015>

MAVER, B.M; MRAVAK-STIPETIC M; JEROLIMOV. V. Effect of low-level laser therapy on *Candida albicans* growth in patients with denture stomatitis. **Photomed Laser Surg.** 2005

PEREIRA, P. C de S. Estudos Físicos-Químicos do corante Rosa de Bengala B e seus derivados ésteres visando aplicações fotodinâmicas. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento. Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Maringá, 2013.

PERUSSI, J. R. Inativação Fotodinâmica de Microrganismos **Quim. Nova**, Vol. 30, Nº.4, p. 988-994, 2007.

RIBEIRO J. N., JORGE R. A., SILVA A. R. da, FLORES A. V., RONCHI L. M., TEDESCO A. C. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. **Eclética Química**. Vol 32. Nº 1. P. 7-14., São Paulo, 2007.

SCHAFER, M.; SCHMITZ, C.; FACIUS, R.; HORNECK, G.; MILOW, B. Systematic Study of Parameters Influencing the Action of Rose Bengal with Visible Light on Bacterial Cells:

Comparison Between the Biological Effect and Singlet-Oxygen Production. **Photochemistry and Photobiology**,. Vol. 71. Nº 5. p. 514–523., 2000. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2000\)071<0514:SSOPIT>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2000)071<0514:SSOPIT>2.0.CO;2)

SILVA, M. P. TERAPIA FOTODINÂMICA EM ESPOROS DE *Bacillus atropheus* E *Bacillus subtilis*: estudos com LASER, LED, azul de metileno, rosa bengala e verde malaquita. Dissertação Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. São José dos Campos, 2012.

SILVA, A.B; BLAYA, M.B; HIRAKATA, L; MEDINA, S. R. Uso da levedura *Saccharomyces Cerevisiae* para avaliação da toxicidade celular induzida por mini implantes ortodônticos. **X**

**Salão de Iniciação Científica.** Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Porto Alegre, 2009.

SIMPLÍCIO F. I; MAIONCHI. F; HIOKA N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Quim. Nova**, Vol. 25, No. 5, 801-807, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000500016>

SONG A., J.; ZHANG, M.; ZHANG, T.; SHEN, J. T. Spectral properties and structure of fluorescein and its alkyl derivatives in micelles, Colloids and Surfaces, **Science Direct**. V.167. N°3, p. 253–262. 2000.

THOMAS, P., SEKHAR, A. C., UPRETI, R., MUJAWAR, M. M., & PASHA, S. S. Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples. **Biotechnology Reports**, N°8. p.45–55. (2015). <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.08.003>

VARA, J.; Ortiz, C. S. Thiazine dyes: Evaluation of monomeric and aggregate forms. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, p.112–120. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.05.005>