



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DE FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR NA
FOTOINATIVAÇÃO DE MICRORGANISMO**

LAURA BEATRIZ DOS SANTOS COSTA

Foz do Iguaçu

2025



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DE FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR NA FOTOINATIVAÇÃO DE MICRORGANISMO

Laura Beatriz dos Santos Costa

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto
Latino-Americano de Ciências da Vida e
da Natureza da Universidade Federal da
Integração Latino-Americana, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marciana
Pierina Uliana Machado

Foz do Iguaçu

2025

LAURA BEATRIZ DOS SANTOS COSTA

**AVALIAÇÃO DE FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR NA
FOTOINATIVAÇÃO DE MICRORGANISMO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto
Latino-Americano de Ciências da Vida
e da Natureza da Universidade Federal
da Integração Latino-Americana, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Marciana Pierina Uliana Machado

UNILA

Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini

UNILA

Profa. Dra. Paula Andrea Jaramillo Garcia

UNILA

Foz do Iguaçu, 18 de dezembro de 2025.

Dedico este trabalho à minha família, que
viveu esta etapa comigo, fazendo-se
presente mesmo estando longe. Cada linha
aqui escrita carrega um pouco da
paciência, do incentivo e do amor de vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por ter me concedido a saúde e a força necessárias para superar os obstáculos desta jornada. A fé foi meu sustento nos momentos de incerteza e minha guia até este momento.

Aos meus pais, Maria Lúcia e Valdemar, não há palavras que descrevam a gratidão que sinto por todo o amor, pelos sacrifícios e pela dedicação que tiveram para que eu pudesse trilhar este caminho. Vocês são a razão de eu estar aqui e a base de tudo o que sou.

À minha avó, Laura, por suas orações, por sua sabedoria e pelo colo que sempre me acolheu - seu apoio incondicional ficará para sempre em minha memória.

Aos meus tios, Marco, Carlos e Célia pela presença constante em minha vida, pela torcida vibrante a cada conquista e por todo o carinho que sempre me deram.

Aos meus padrinhos, Estela, André e Neire, um agradecimento especial. Vocês foram fundamentais na construção deste sonho, oferecendo um incentivo decisivo aos meus estudos. Obrigada por acreditarem no poder transformador da educação e por investirem no meu potencial. Agradeço, ainda, pelo inestimável apoio emocional, pelo acolhimento e por serem meu refúgio de afeto e segurança sempre que precisei. À Maria Auxiliadora, agradeço por sempre acreditar, incentivar e direcionar sua fé à mim.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marciana Uliana Machado, por todo o apoio e direcionamento na construção deste trabalho. Sua gentileza e compreensão foram fundamentais para o meu desenvolvimento, não apenas como pesquisadora, mas, também, como pessoa.

À Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), por ser um espaço plural que me proporcionou muito mais do que recursos e oportunidades: ofereceu-me uma nova visão de mundo. E, com especial carinho, aos docentes que cruzaram o meu caminho. Agradeço não apenas pelo conhecimento técnico repassado, mas pelo incentivo, escuta e um exemplo de profissionalismo que lembrarei para sempre.

Ao Departamento de Laboratórios de Ensino (DELABEN), pelo suporte logístico e estrutural que garantiu a excelência dos nossos laboratórios. E, de forma especial, à Juliana Kafka. Acompanhar parte do seu doutorado de perto foi um divisor de águas: obrigada por me ensinar, pelo exemplo, a ter paixão pela pesquisa científica.

Às minhas amigas Maria Catalan, Aline, Ilenia, Isabela, Heissy, Rosangel, Verónica, e Maria Spacki, pela sensibilidade e afeto essenciais. Aos meus amigos, Sebastián, Christian, Leonardo e Rafael, pelo apoio e acolhimento. Ao Andres, por toda parceria e incentivo ao longo desses anos. À Julia, por tantos conselhos e gestos de carinho que foram essenciais para que eu acreditasse em mim nos momentos mais difíceis. Ao Matheus Luft, pelos

abraços que fizeram com que eu me sentisse em casa, e à Kauanny, por me dar uma família em Foz e sempre alegrar meus dias.

E, fundamentalmente, ao Matheus Moraes, que se tornou um irmão para mim: viver cada momento ao seu lado, com tanta entrega, tornou esta etapa leve e divertida.

Ao meu namorado, João Pedro, que torna a minha vida infinitamente melhor. Obrigada pelo apoio inestimável, por nunca medir esforços para me ver feliz e por ter o dom de deixar meus dias mais tranquilos, mesmo nos momentos mais difíceis. Estendo minha gratidão à Cláudia, Ronald e Maria Clara, por me receberem de braços abertos e por me permitirem sentir, junto a vocês, o calor de um lar.

RESUMO

A resistência antimicrobiana representa uma das maiores ameaças à saúde pública global, exemplificada por patógenos como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), que desafiam os tratamentos convencionais. Neste cenário, a Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) emerge como uma alternativa promissora, utilizando a interação entre luz, oxigênio e um fotossensibilizador (FS) para gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) que causam dano celular oxidativo inespecífico, dificultando a seleção de cepas resistentes. O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de um fotossensibilizador da classe de bacterioclorinas (Bacterioclorina Fitol), a qual foi obtida da bactéria *Rhodopseudomonas faecalis*. Os ensaios de fotoinativação contra *S. aureus* exploraram variáveis como os tempos de incubação pré-irradiação, que foram de 20 e 40 minutos, nas concentrações de 1, 10, 100 e 200 μM . Também foram avaliados duas fontes de irradiação com diferentes comprimentos de onda, que foram 760 nm e 780 nm, com doses de luz de 30 e 45 J/cm^2 . A bacterioclorina Fitol não apresentou inativação do microrganismo nas concentrações de 1 e 10 μM nas doses de luz de 30 e 45 J/cm^2 . Já nas concentrações de 100 e 200 μM e nas doses de luz de 30 e 45 J/cm^2 , mostrou uma redução de aproximadamente 1 log quando comparado com o controle, tanto para a fonte de iluminação de 760 nm quanto para a de 780 nm, demonstrando que as duas fontes de iluminação podem ser utilizadas para esta classe de compostos. No que se refere aos tempos de incubação do fotossensibilizador, as condições testadas de 20 e 40 minutos não apresentaram resultados distintos, indicando que ambos os tempos de incubação são adequados para a fotoinativação de *S. aureus*. Este estudo contribui para o entendimento dos fatores que podem afetar na fotoinativação de microrganismos multirresistentes, concluindo que as duas fontes de iluminação bem como os dois tempos de incubação testados, não alteram o crescimento do microrganismo.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; resistência antimicrobiana; *Staphylococcus aureus*; bacterioclorinas; *Rhodopseudomonas faecalis*.

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana representa una de las mayores amenazas para la salud pública global, ejemplificada por patógenos como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), que desafían los tratamientos convencionales. En este escenario, la Terapia Fotodinámica antimicrobiana (TFDa) emerge como una alternativa prometedora, utilizando la interacción entre luz, oxígeno y un fotosensibilizador (FS) para generar especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan daño celular oxidativo inespecífico, dificultando la selección de cepas resistentes. El presente trabajo tuvo como objetivo la obtención de un fotosensibilizador de la clase de las bacterioclorinas (Bacterioclorina Fitol), la cual fue obtenida de la bacteria *Rhodopseudomonas faecalis*. Los ensayos de fotoinactivación contra *S. aureus* exploraron variables como los tiempos de incubación pre-irradiación, que fueron de 20 y 40 minutos, en las concentraciones de 1, 10, 100 y 200 μM . También se evaluaron dos fuentes de irradiación con diferentes longitudes de onda, 760 nm y 780 nm, con dosis de luz de 30 y 45 J/cm^2 . La Bacterioclorina Fitol no presentó inactivación del microorganismo en las concentraciones de 1 y 10 μM en las dosis de luz de 30 y 45 J/cm^2 . Sin embargo, en las concentraciones de 100 y 200 μM y en las dosis de luz de 30 y 45 J/cm^2 , mostró una reducción de aproximadamente 1 log en comparación con el control, tanto para la fuente de iluminación de 760 nm como para la de 780 nm, demostrando que ambas fuentes de iluminación pueden ser utilizadas para esta clase de compuestos. En lo que se refiere a los tiempos de incubación del fotosensibilizador, las condiciones probadas de 20 y 40 minutos no presentaron resultados distintos, indicando que ambos tiempos son adecuados para la fotoinactivación de *S. aureus*. Este estudio contribuye al entendimiento de los factores que pueden afectar la fotoinactivación de microorganismos multirresistentes, concluyendo que las dos fuentes de iluminación, así como los dos tiempos de incubación probados, no alteran el crecimiento del microorganismo.

Palabras clave: terapia fotodinámica; resistencia antimicrobiana; *Staphylococcus aureus*; bacterioclorinas; *Rhodopseudomonas faecalis*.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance represents one of the greatest threats to global public health, exemplified by pathogens such as Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), which challenge conventional treatments. In this scenario, Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) emerges as a promising alternative, utilizing the interaction between light, oxygen, and a photosensitizer (PS) to generate reactive oxygen species (ROS) that cause non-specific oxidative cellular damage, hindering the selection of resistant strains. The objective of the present work was to obtain a photosensitizer of the bacteriochlorin class (Phytol Bacteriochlorin), which was derived from the bacterium *Rhodopseudomonas faecalis*. Photoinactivation assays against *S. aureus* explored variables such as pre-irradiation incubation times, which were 20 and 40 minutes, at concentrations of 1, 10, 100, and 200 μM . Two irradiation sources with different wavelengths, 760 nm and 780 nm, were also evaluated with light doses of 30 and 45 J/cm^2 . Phytol Bacteriochlorin showed no microorganism inactivation at concentrations of 1 and 10 μM at light doses of 30 and 45 J/cm^2 . However, at concentrations of 100 and 200 μM and light doses of 30 and 45 J/cm^2 , it showed a reduction of approximately 1 log compared to the control, for both the 760 nm and 780 nm light sources, demonstrating that both illumination sources can be used for this class of compounds. Regarding photosensitizer incubation times, the tested conditions of 20 and 40 minutes did not yield distinct results, indicating that both incubation times are suitable for the photoinactivation of *S. aureus*. This study contributes to the understanding of factors that may affect the photoinactivation of multidrug-resistant microorganisms, concluding that neither the two inactivation sources nor the two incubation times tested alter the microorganism's growth.

Keywords: photodynamic therapy; antimicrobial resistance; *Staphylococcus aureus*; bacteriochlorins; *Rhodopseudomonas faecalis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Paredes celulares de bactérias Gram-positivas (a) e Gram-negativas (b).....	22
Figura 2. Diagrama de Jablonski.....	23
Figura 3. Estrutura de macrociclos tetrapirrólicos, com as diferentes saturações indicadas em vermelho.....	26
Figura 4. Espectro UV-Vis de derivados de produtos porfirinóides.....	26
Figura 5. Imagem ilustrativa do comprimento de onda e seu alcance no tecido.	27
Figura 6. Exemplo de moléculas que absorvem luz na região de 400 a 700 nm.	28
Figura 7. Cultivo de <i>Rhodopseudomonas faecalis</i> . A) Cultura realizada em frascos de 1 L em incubadora BOD; B) Cultivo bacteriano em placa de Petri para confirmação da morfologia bacteriana. C) Centrifugação da biomassa bacteriana.....	31
Figura 8. A) Extração da bacterioclorina sob atmosfera de argônio; B) Cromatografia em coluna de sílica gel para extração da bacterioclorina fitil.....	32
Figura 9. Esquema da metodologia da TFD e plaqueamento.....	34
Figura 10. Equipamento Biolambda - irradiação com LED em 760 nm.....	35
Figura 11. Equipamento Biotable- irradiação com LED em 780 nm.....	35
Figura 12. Material utilizado para cada ensaio de fotoinativação.....	36
Figura 13. Placas de 24 poços com o delineamento experimental do ensaio de fotoinativação com Bchl-F. A) Placa com grupos controle; B) Placa com grupos de tratamento submetidos a 760 nm; C) Placa com grupos submetidos a 780 nm.....	37
Figura 14. Estrutura da Bacterioclorina Fitil (Bchl-F).....	39
Figura 15. Espectro de absorção da Bacterioclorina Fitil.....	40
Figura 16. Contagem de UFCs de grupos de tratamento com fotossensibilizador Bchl-F.....	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Inativação fotodinâmica com Bacterioclorina Fitol a 1 e 10 μM	42
Gráfico 2. Inativação fotodinâmica com Bacterioclorina Fitol a 100 e 200 μM	45
Gráfico 3. (A) Efeito da concentração de Bchl-F sobre $\log(\text{UFC/mL})$ em que as médias gerais incluem todas as condições de luz, dose e tempo agrupadas.....	48
Gráfico 4. Efeito do comprimento de onda de irradiação (760 nm e 780 nm) sobre a fotoinativação de <i>S. aureus</i> representado por médias agrupadas de dose de luz e tempo de incubação.....	49
Gráfico 5. Efeito do tempo de incubação pré-irradiação (20 e 40 minutos) sobre a fotoinativação de <i>S. aureus</i> representado por médias agrupando comprimento de onda e dose de luz.....	50
Gráfico 6. Efeito da dose de luz (30 e 45 J/cm^2) sobre a fotoinativação de <i>S. aureus</i> representado por médias agrupando comprimento de onda e tempo de incubação....	50
Gráfico 7. Mapa de Calor do resumo estatístico.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
aPDT	<i>Antimicrobial Photodynamic Therapy</i> (Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana)
Bchl-F	Bacterioclorina Fitol (Phytol)
BHI	<i>Brain-Heart-Infusin</i> (Infusão Cérebro-Coração)
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i> (Demanda Química de Oxigênio)
DMSO	Dimetilsulfóxido (solvente)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
DO	Densidade Óptica
EPS	<i>Extracellular Polymeric Substances</i> (Substâncias Poliméricas Extracelulares)
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FS	Fotossensibilizador
ISC	<i>Intersystem Crossing</i> (Cruzamento Intersistemas)
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
L	Litro
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> (Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação)
LED	<i>Light Emitting Diode</i> (Diodo Emissor de Luz)
Log	Logaritmo
Me	Metila
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
N ₄	Nitrogênio (indicando 4 átomos na fórmula molecular)

nm	Nanômetro
O ₂	Oxigênio molecular
¹ O ₂	Oxigênio singlete
³ O ₂	Oxigênio tripleto
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solução Salina Tamponada com Fosfato)
PS	<i>Photosensitizer</i> (Fotossensibilizador)
rpm	Rotações por minuto
So	Estado fundamental
S1	Estado excitado singlete
TFD	Terapia Fotodinâmica
TFDa	Terapia Fotodinâmica antimicrobiana
T1	Estado excitado tripleto
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por mililitro
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
λ _{max}	Lambda máximo
μM	Micromolar
°C	Graus Celsius

'	Minuto
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 O PROBLEMA GLOBAL DOS MICRORGANISMOS MULTIRRESISTENTES.....	19
2.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS.....	21
2.3 FUNDAMENTOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD).....	23
2.4 FOTOSSENSIBILIZADORES TETRAPIRRÓLICOS.....	24
2.5 FATORES QUE PODEM AFETAR A EFICIÊNCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD) OU DA FOTOINATIVAÇÃO.....	29
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 OBJETIVO GERAL.....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 OBTENÇÃO DE BACTERIOCLORINA.....	31
4.2 FOTOINATIVAÇÃO MICROBIANA.....	33
4.3 FONTE DE ILUMINAÇÃO.....	35
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	40
6 CONCLUSÕES.....	54

1 INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana representa uma das mais graves ameaças à saúde pública global no século XXI. Organizações como a Organização Mundial da Saúde (OMS) alertam para uma era pós-antibiótica, na qual infecções comuns e lesões menores podem se tornar fatais devido à ineficácia dos medicamentos existentes (OMS, 2018). Este cenário é agravado pela drástica redução no desenvolvimento de novas classes de antibióticos nas últimas décadas, tornando imperativa a exploração de terapias alternativas. Patógenos como *Staphylococcus aureus*, incluindo suas cepas resistentes à meticilina (MRSA), são exemplos paradigmáticos de microrganismos que desenvolvem altos níveis de resistência a múltiplas drogas. Este microrganismo também forma biofilmes, estruturas complexas que os protegem da ação de antimicrobianos e do sistema imune do hospedeiro, complicando ainda mais o tratamento de infecções (DOUGLAS, 2003).

A gravidade da situação é amplificada pela biologia dos biofilmes. Estima-se que mais de 80% das infecções bacterianas crônicas em humanos estejam associadas a biofilmes — comunidades sésseis de microrganismos envoltas em uma matriz polimérica extracelular auto secretada. Esta matriz atua não apenas como uma barreira física à difusão de antibióticos, mas também cria microambientes com gradientes de nutrientes e oxigênio que induzem o estado de dormência em células profundas ("células persistentes"). Estas células, metabolicamente inativas, são fenotipicamente tolerantes à maioria dos antibióticos que dependem da replicação ativa para exercer sua toxicidade, resultando em falhas terapêuticas recorrentes e cronicidade da infecção (DOUGLAS, 2003).

Neste contexto, a Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) surge como uma abordagem terapêutica promissora e não invasiva, especialmente para o tratamento de infecções localizadas. A TFDa é uma modalidade terapêutica que se baseia na interação sinérgica de três componentes que, individualmente, são inócuos: um composto fotossensibilizador (FS), que é uma molécula capaz de absorver luz; uma fonte de luz visível com um comprimento de onda específico, que corresponda precisamente ao espectro de absorção do

FS; e o oxigênio molecular (O_2) endogenamente presente nos tecidos biológicos. O princípio fundamental da TFDa reside em seu mecanismo de ação singular: a luz ativa o FS, que por sua vez transfere energia para o oxigênio, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) altamente citotóxicas, como o oxigênio singlete (1O_2) e radicais livres (CIEPLIK *et al.*, 2018).

A principal vantagem estratégica da TFDa sobre os antibióticos convencionais consiste no seu baixo potencial para induzir o desenvolvimento de resistência microbiana. Enquanto os antibióticos atuam em alvos moleculares altamente específicos (como uma enzima ou um ribossomo), o que permite que uma única mutação genética possa conferir resistência, as EROs geradas na TFDa promovem um ataque massivo e inespecífico. Elas oxidam indiscriminadamente uma vasta gama de biomoléculas essenciais para a sobrevivência do microrganismo, incluindo lipídios que compõem a membrana celular, proteínas estruturais e enzimáticas, e os ácidos nucleicos que guardam a informação genética. Este dano celular generalizado torna extremamente improvável que um microrganismo consiga desenvolver, através de mutações, um conjunto coordenado de mecanismos de defesa que o proteja de forma eficaz. Portanto, a TFDa não representa apenas um novo agente terapêutico, mas uma mudança de paradigma, de uma abordagem de "alvo único" para uma de "dano celular massivo" (CIEPLIK *et al.*, 2018).

Entretanto, a literatura científica recente tem enfatizado que a eficácia da TFDa não depende exclusivamente da química do FS, mas sim da otimização das variáveis de processo, como por exemplo, a concentração do FS, a dose de luz, bem como destaca-se o tempo de contato pré-irradiação (*Drug-Light Interval*), também chamado de tempo de incubação, e a correspondência espectral da fonte de luz. O tempo de incubação define a quantidade e a localização subcelular do FS no momento da irradiação. Estudos cinéticos de captação demonstram um comportamento frequentemente bifásico. Uma fase rápida inicial corresponde à adsorção do FS à superfície celular (parede celular), seguida por uma fase mais lenta de translocação ou difusão para estruturas internas ou integração profunda na bicamada lipídica (AMORIM, 2022).

Além do contato pré-irradiação, o comprimento de onda e a largura de bandas da fonte de irradiação também são cruciais para a TFDa. A Lei de Grotthuss-Draper, a primeira lei da fotoquímica, estabelece que apenas a luz que é absorvida por um sistema pode produzir uma mudança química. Na era dos LASERs (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) e LEDs (*Light Emitting Diode*), a precisão espectral tornou-se crítica. Enquanto fontes de luz branca cobrem todo o espectro, LEDs de alta potência emitem em bandas mais estreitas, interferindo diretamente no número de fótons efetivamente absorvidos e, portanto, a quantidade de $^1\text{O}_2$ gerada, podendo transformar um tratamento eficaz em inócuo (ROHATGI-MUKHERJEE, 1978).

Este trabalho propõe, então, a avaliação fotodinâmica comparativa do FS derivado da bacterioclorina, variando os tempos de incubação do fotossensibilizador (20 e 40 minutos). Também foi avaliado duas fontes de irradiação, uma com a biotable com luz no comprimento de onda de 760 nm e outra fonte de iluminação com comprimento de onda de 780 nm. Este estudo tem como objetivo avaliar se os diferentes tempos de incubação e as diferentes fontes de iluminação interferem de forma considerável na fotoinativação de microrganismos *Staphylococcus aureus*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O PROBLEMA GLOBAL DOS MICRORGANISMOS MULTIRRESISTENTES

Antes da descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928, a humanidade vivia em uma realidade onde uma simples infecção bacteriana poderia ser uma sentença de morte. Procedimentos cirúrgicos eram extremamente arriscados, e doenças como pneumonia, tuberculose e infecções de feridas ceifaram milhões de vidas. A introdução dos antimicrobianos na metade do século XX transformou este cenário, inaugurando uma era de ouro na medicina, na qual a mortalidade por doenças infecciosas despencou e procedimentos médicos complexos, como transplantes de órgãos, quimioterapias e cirurgias de grande porte, tornaram-se rotineiros e seguros (VANEGAS-MÚNERA; JIMÉNEZ-QUICENO, 2020).

Contudo, este pilar fundamental da saúde moderna está sob grave ameaça. O sucesso dos antibióticos levou ao seu uso massivo e, frequentemente, inadequado, não apenas na medicina humana, mas também de forma extensiva na agropecuária e na medicina veterinária, seja para tratamento, profilaxia ou como promotores de crescimento. Esta exposição generalizada e constante dos microrganismos aos fármacos criou uma pressão seletiva implacável em escala planetária. Em uma demonstração clássica de evolução darwiniana, as populações microbianas que, por acaso, possuíam ou adquiriam mutações que lhes conferiam vantagem de sobrevivência na presença de um antibiótico, foram selecionadas e se proliferaram, enquanto as suscetíveis foram eliminadas (SILVA *et al.*, 2020).

Este processo deu origem ao fenômeno da Resistência Antimicrobiana, que se manifesta quando bactérias, fungos e parasitas evoluem a ponto de não mais responderem aos medicamentos utilizados para tratá-los. O problema é exacerbado pela notável plasticidade genética dos microrganismos, que lhes permite não apenas desenvolver resistência através de mutações espontâneas, mas também adquirir genes de resistência de outros microrganismos através de mecanismos de transferência horizontal de genes (conjugação, transdução

e transformação). Isso permite que a resistência se dissemine rapidamente entre diferentes espécies e populações bacterianas (CRISTALDO; IRMÃO; MATUO, 2022).

Como resultado, beira-se uma “era pós-antibiótico”, um cenário catastrófico em que os antibióticos podem perder sua eficácia. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a resistência antimicrobiana como uma das dez maiores ameaças à saúde pública global. E, a situação é agravada pela estagnação do desenvolvimento de novos antimicrobianos. A maioria dos “novos” antibióticos lançados no mercado são apenas modificações de classes já existentes, contra as quais os microrganismos frequentemente já possuem mecanismos de resistência. O alto custo, o longo tempo de desenvolvimento e o baixo retorno financeiro desincentivaram a indústria farmacêutica a investir na pesquisa e desenvolvimento de novas moléculas verdadeiramente inovadoras (DE MACÊDO, 2000) (MORALES; CALDAS, 2010).

Um desafio adicional no tratamento de infecções é a capacidade de muitos patógenos de formar biofilmes, comunidades microbianas altamente estruturadas, aderidas a uma superfície e envoltas por uma matriz autoproduzida de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Esta matriz de polissacarídeos, proteínas e DNA (ADN, em português: ácido desoxirribonucleico) extracelular funciona como uma fortaleza, protegendo as células em seu interior do sistema imune do hospedeiro e, crucialmente, impedindo a penetração de agentes antimicrobianos. Estima-se que microrganismos vivendo em um biofilme possam ser de 10 a 1.000 vezes mais resistentes aos antibióticos do que suas contrapartes de vida livre, tal que atua como um fator central na cronicidade de muitas infecções associadas a dispositivos médicos (cateteres, próteses) e infecções pulmonares em pacientes com fibrose cística (PASTERNAK, 2009).

Desta forma, o foco se volta para patógenos de alto risco clínico, como a bactéria *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina, endêmica em ambientes hospitalares e responsável por provocar um amplo espectro de infecções, desde abscessos cutâneos a condições graves como pneumonia, endocardite e sepse. Menciona-se também a *Pseudomonas aeruginosa*, uma

bactéria Gram-negativa oportunista, conhecida por sua resistência intrínseca a múltiplas classes de antibióticos e sua alta capacidade de formar biofilmes, sendo a causa de infecções hospitalares, especialmente em pacientes imunocomprometidos e em unidades de terapia intensiva (SERRA *et al.* 2015).

Diante deste cenário, em que bactérias desenvolvem mecanismos complexos para evadir tratamentos, torna-se urgente o desenvolvimento de estratégias terapêuticas radicalmente alternativas. A Terapia Fotodinâmica (TFD), com seu mecanismo de ação oxidativo e de múltiplos alvos, representa uma dessas frentes de esperança, capaz de contornar os mecanismos de resistência específicos que tornam os fármacos convencionais ineficazes.

2.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS

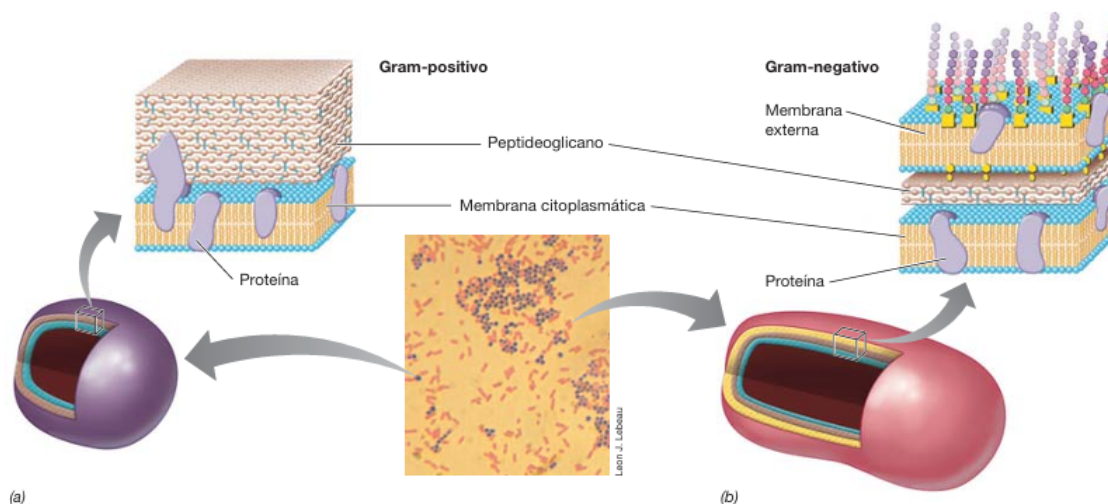
A resistência bacteriana é um fenômeno complexo, impulsionado por uma combinação de barreiras estruturais intrínsecas, mecanismos moleculares adaptativos e uma notável capacidade de compartilhar informações genéticas. A primeira linha de defesa de uma bactéria ocorre na estrutura da parede celular, que é a principal característica que as divide em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas, distinção que é fundamental para entender a suscetibilidade a antimicrobianos (MADIGAN *et al.*, 2016).

As bactérias Gram-positivas possuem uma parede celular relativamente simples (Figura 1.a), composta por uma espessa e porosa camada de peptidoglicano, que envolve a membrana citoplasmática. Essa estrutura permite a passagem de uma gama maior de moléculas, tornando-as, em geral, mais suscetíveis a muitos antibióticos e fotossensibilizadores (SERRA *et al.*, 2015) (MADIGAN *et al.*, 2016).

Já as bactérias Gram-negativas, apresentam uma arquitetura de parede celular muito mais complexa (Figura 1.b). Além de uma fina camada de peptidoglicano, elas possuem uma membrana externa, uma bicamada lipídica assimétrica rica em lipopolissacarídeos. Essa membrana externa confere à superfície bacteriana uma densa carga negativa e atua como uma barreira de permeabilidade altamente seletiva, que repele ativamente moléculas hidrofóbicas, aniônicas ou neutras, dificultando o acesso de muitos fármacos

ao seu interior. Esta é a principal razão pela qual as bactérias Gram-negativas são intrinsecamente mais resistentes a muitos tratamentos, incluindo a TFD com fotossensibilizadores não catiônicos (SERRA *et al.*, 2015) (MADIGAN *et al.*, 2016).

Figura 1. Paredes celulares de bactérias Gram-positivas (a) e Gram-negativas (b).



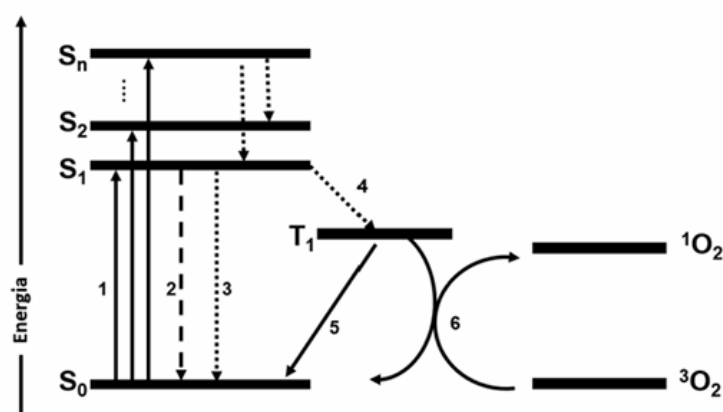
Fonte: Retirado de Microbiologia de Brock - 14ª Edição, 2016.

Dentre os principais mecanismos para neutralizar a ação de antibióticos, pode-se citar a modificação do alvo molecular específico na bactéria, em que mutações no gene que codifica esse alvo podem alterar sua estrutura, impedindo ou diminuindo a afinidade de ligação do fármaco, tornando-o ineficaz. Além disso, bactérias são capazes de produzir enzimas que modificam quimicamente ou degradam o antibiótico antes que ele possa atingir seu alvo. O exemplo mais clássico são as β -lactamases, que hidrolisam o anel β -lactâmico de antibióticos como a penicilina. No mais, bombas de efluxo (complexos proteicos a membrana celular) são capazes de reconhecer e expelir ativamente os antibióticos para fora da célula, de modo que podem manter a concentração intracelular do fármaco abaixo do nível terapêutico. Por fim, algumas mutações são capazes de alterar as proteínas de canal (porinas) na membrana externa das bactérias Gram-negativas, diminuindo o diâmetro do poro ou o número de canais, restringindo, conseqüentemente, a entrada do antibiótico na célula (BABIC; HUJER, BONOMO, 2006).

2.3 FUNDAMENTOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)

A TFDa explora princípios fotofísicos e fotoquímicos para induzir a morte celular. Os processos fundamentais são precisamente descritos pelo diagrama de Jablonski (Figura 2). Inicialmente, o FS em seu estado fundamental (S_0) absorve um fóton de luz, sendo promovido a um estado excitado singlete de curta duração (S_1). A partir do estado S_1 , a molécula pode retornar ao estado fundamental emitindo luz (fluorescência) ou, crucialmente para a aPDT, pode sofrer um processo de transição de spin conhecido como cruzamento intersistemas (ISC, do inglês *intersystem crossing*), chegando ao estado excitado tripleto de vida mais longa (T_1) (FRACKOWIAK, 1988) (BILHA, 2025).

Figura 2. Diagrama de Jablonski.



Fonte: Retirado de Bilha, 2025.

Uma vez no estado T_1 , o FS pode iniciar duas vias fotoquímicas principais para a geração de EROs. No Mecanismo Tipo I, o FS excitado transfere um elétron diretamente para uma molécula do substrato (como lipídios ou proteínas) ou para o oxigênio molecular, formando radicais livres como o ânion superóxido (O_2^-) e, subsequentemente, o radical hidroxila ($\cdot OH$), que são altamente reativos. Enquanto no Mecanismo Tipo II o FS excitado transfere sua energia diretamente para o oxigênio molecular no estado fundamental (que é um estado tripleto, 3O_2), gerando oxigênio singlete (1O_2), que é um oxidante extremamente potente e é considerado o principal agente

citotóxico na maioria dos protocolos de TFDa. Ressalta-se que a predominância de um mecanismo sobre o outro depende das características do FS, da concentração de oxigênio e da natureza do ambiente biológico, sendo comum que ambos os processos ocorram simultaneamente (FRACKOWIAK, 1988) (BILHA, 2025).

O resultado de ambos os mecanismos é a indução de um estresse oxidativo massivo e localizado. No contexto específico da inativação de microrganismos, esse ataque oxidativo é multi-alvo. As EROs, especialmente o oxigênio singleto, interagem rapidamente com a parede celular e a membrana citoplasmática bacteriana/fúngica, causando a perda da integridade estrutural e funcional da barreira celular, levando ao extravasamento de componentes intracelulares vitais e ao colapso do potencial eletroquímico da membrana. Embora danos ao DNA genômico e plasmidial possam ocorrer, a morte microbiana é geralmente atribuída à destruição do envelope celular, o que impede que o microrganismo desenvolva mecanismos de resistência convencionais. Esse dano generalizado culmina na inviabilidade celular irreversível (FRACKOWIAK, 1988) (BILHA, 2025).

2.4 FOTOSSENSIBILIZADORES TETRAPIRRÓLICOS

Os macrociclos tetrapirrólicos são a base estrutural dos fotossensibilizadores mais eficazes. Entre eles, destacam-se as clorinas e as bacterioclorinas, que são derivados hidrogenados da porfirina. As clorinas, como a clorofila-a, possuem um anel pirrólico reduzido (uma di-hidroporfirina), enquanto as bacterioclorinas, como a bacterioclorofila-a, possuem dois anéis pirrólicos reduzidos em posição oposta (uma tetra-hidroporfirina) (HOARD; SMITH, 1975).

Clorinas são formalmente definidas como di-hidroporfirinas, macrociclos tetrapirrólicos derivados da porfirina (Figura 3.a), que servem como estrutura parental para uma vasta família de compostos biológicos e sintéticos. A característica determinante de uma clorina é a saturação de uma das ligações duplas carbono-carbono em um dos seus quatro anéis pirrólicos constituintes, convertendo-o num anel de pirrolina (Figura 3.b). Esta modificação estrutural,

aparentemente menor, é o determinante central das propriedades fotofísicas e eletrônicas únicas que distinguem as clorinas das suas análogas porfirinas totalmente aromáticas. É esta alteração que confere às clorinas a sua cor verde característica e a sua capacidade de absorver fortemente a luz na região vermelha do espectro visível, uma propriedade que a natureza aperfeiçoou para a fotossíntese e que a ciência moderna explora para aplicações tecnológicas avançadas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015).

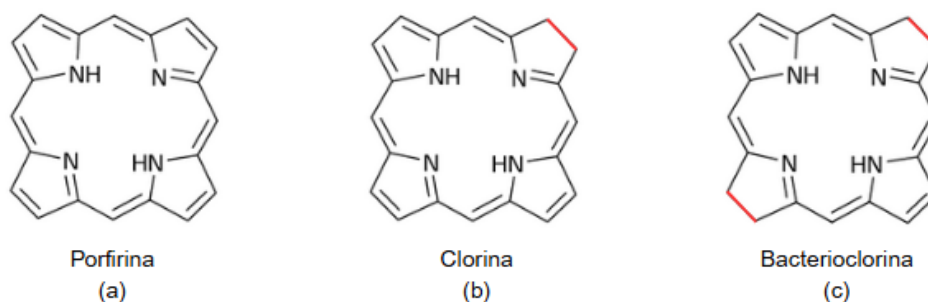
A clorina representa o primeiro passo na hidrogenação da porfirina. A sua principal característica estrutural consiste na redução (saturação) de uma única ligação dupla β,β' num dos quatro anéis pirrólicos, transformando-o num anel de pirrolina. O nome IUPAC para o macrociclo parental é 2,3-Di-hidroporfirina, com a fórmula química $C_{20}H_{16}N_4$. Esta saturação parcial quebra a extensa conjugação cíclica da porfirina. E, embora o macrociclo permaneça predominantemente aromático, o percurso de deslocalização é interrompido no anel reduzido. Esta alteração tem consequências profundas, a mais notável sendo a quebra da simetria molecular, sendo a causa fundamental das propriedades ópticas únicas da clorina (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015) (NCBI, 2025).

Ademais, a hidrogenação pode prosseguir, levando a tetraidroporfirinas com dois anéis de pirrolina. A regioseletividade desta segunda redução define duas classes distintas de isómeros, em que se destacam bacterioclorinas (Figura 3.c). Nestes compostos, dois anéis pirrólicos *opostos* são reduzidos. Esta hidrogenação em posições trans-anulares mantém um eixo de simetria C_2 e define um percurso de conjugação linear através do macrociclo (COSTA; COSTA; TOMÉ, 2016) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015).

A hidrogenação progressiva também aumenta a flexibilidade conformacional do macroanel. Enquanto as porfirinas são maioritariamente planares, as clorinas e, em particular, as bacterioclorinas, podem adotar conformações não planares, como "*ruffled*" (onduladas) ou "*saddle*" (em sela). Estas distorções podem ser intrínsecas ou induzidas pelo ambiente proteico circundante, como observado em complexos fotossintéticos, e podem modular

ainda mais as propriedades redox e fotofísicas do cromóforo (COSTA; COSTA; TOMÉ, 2016) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015).

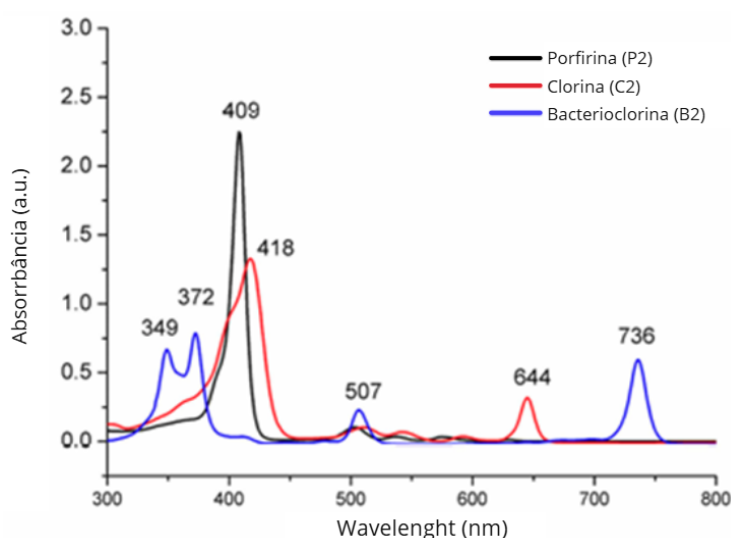
Figura 3. Estrutura de macrociclos tetrapirrólicos, com as diferentes saturações indicadas em vermelho.



Fonte: Autoria própria, 2025.

A diferença estrutural impacta diretamente em suas propriedades ópticas e, consequentemente, em suas aplicações clínicas. Clorinas apresentam uma banda de absorção intensa na região vermelha do espectro visível, tipicamente entre 650 e 670 nm (banda Q). A classe das bacterioclorinas apresenta uma banda de absorção na região de 750 nm, conforme representado na Figura 4 (HOMEM-DE-MELLO, 2024).

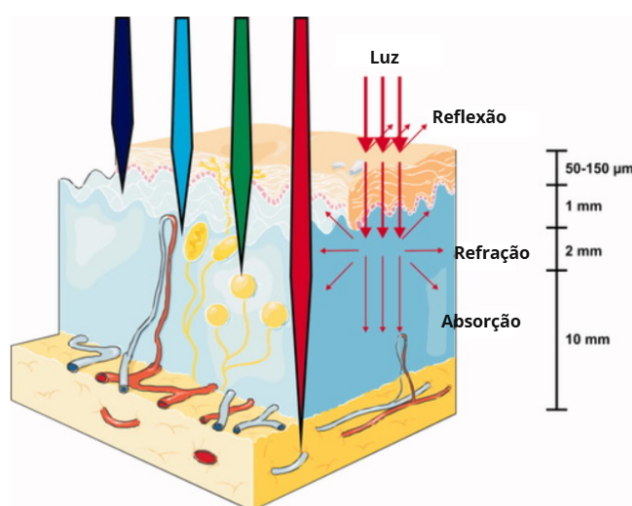
Figura 4. Espectro UV-Vis de derivados de produtos porfirinóides.



Fonte: Adaptado de Homem-de-Mello, 2024.

O tipo de luz apresenta diferente absorção no tecido, sendo assim, alguns comprimentos de onda penetram mais e outros menos. Existe uma estimativa, conforme Figura 5, que os melhores comprimentos de onda para atingir maior profundidade no tecido é na faixa de 700 a 800 nm. Desta forma, os derivados de bacterioclorina que apresentam uma banda de absorção e aproximadamente 760 nm, são bons candidatos como fotossensibilizador, pois podem atuar em tratamentos de infecções mais profundas.(BONNETT, 2000) (GARCIA *et al.*, 2013) (OLIVEIRA *et al.*, 2015) (AGOSTINIS *et al.*, 2011).

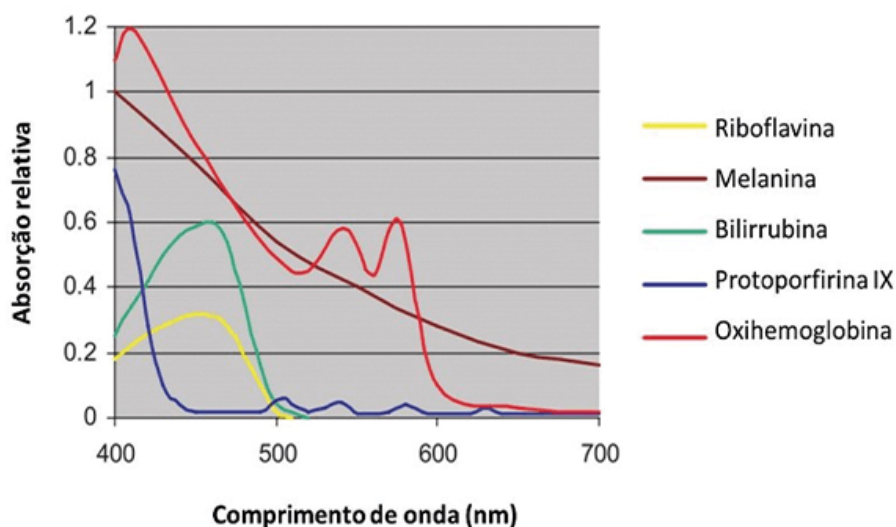
Figura 5. Imagem ilustrativa do comprimento de onda e seu alcance no tecido.



Fonte: Adaptada de Agostinis *et al.*, 2011.

Alguns comprimentos de onda da fonte de iluminação, podem ser absorvidos por substâncias específicas (Figura 6), como por exemplo a bilirrubina absorve a luz entre 400 e 500 nm (causadora da icterícia que é tratada com luz azul). Podemos observar que na região de 600 a 700 nm ou até mesmo acima disso, existem poucas moléculas que absorvem luz nestes comprimentos de onda, o que torna interessante o uso da luz nesta faixa, pois não é absorvida por muitas moléculas. Na região acima de 1000 nm, a água absorve luz e causa aquecimento, podendo causar danos ao tecido (CHEN *et al.*, 2020).

Figura 6. Exemplo de moléculas que absorvem luz na região de 400 a 700 nm.



Fonte: Adaptado de Chen *et al.*, 2020.

Considerando que, na região de 600 a 900 nm se tem uma melhor penetração da luz no tecido e considerando que nesta faixa não existem muitas moléculas que absorvem luz, considerasse essa faixa como sendo uma “janela terapêutica” ou seja a melhor faixa de luz para realização de TFD. Isso justifica o uso e a pesquisa com derivados de clorina (660 nm) e das bacterioclorinas (750 nm) na terapia fotodinâmica (CHEN *et al.*, 2020).

2.5 FATORES QUE PODEM AFETAR A EFICIÊNCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD) OU DA FOTOINATIVAÇÃO

Enquanto há um esforço robusto dedicado à síntese e caracterização química de novos fotossensibilizadores, as variáveis de processo, especificamente o tempo de incubação pré-irradiação e o comprimento de onda da fonte de luz, são frequentemente tratadas como parâmetros padronizados e menos sujeitas a testes comparativos rigorosos. No entanto, a eficácia terapêutica não é apenas uma propriedade intrínseca da molécula, mas uma consequência da interação otimizada entre FS, luz e sistema biológico (PRATES *et al.*, 2015).

Embora o tempo de contato pré-irradiação seja sempre reportado em protocolos experimentais, ele raramente é uma variável independente testada. A tendência é a adoção de tempos fixos genéricos, negligenciando a complexidade da cinética de captação que define a localização subcelular do FS. Estudos cinéticos indicam um comportamento bifásico (adsorção rápida seguida de internalização lenta). A aplicação de um tempo padronizado ignora as barreiras biológicas distintas entre espécies e diferentes moléculas fotossensibilizadoras.

Igualmente, o comprimento de onda da dose de luz também é uma variável crítica frequentemente padronizada, assumindo-se que fontes de luz "na região do vermelho" são intercambiáveis. A Lei de Grotthuss-Draper dita que apenas fótons absorvidos geram efeito. A incompatibilidade entre a banda estreita de emissão de um LED (FWHM $\approx$ 20 nm) e o pico de absorção ($\lambda_{\max}$) do FS pode comprometer severamente a eficiência quântica. Se um FS tem $\lambda_{\max}$ em 775 nm, o uso de um LED comercial padrão de 760 nm incide na "asa azul" do espectro de absorção. Mesmo que a irradiância (J/cm^2) seja mantida, o coeficiente de extinção molar ($\mathcal{E}$) efetivo pode ser reduzido em 50-70%, diminuindo drasticamente a produção de oxigênio singlete e, portanto, a morte celular (CALVETE; GOMES; MOURA, 2009).

A inclusão de comprimentos de onda distintos (760 nm e 780 nm) e dois tempos de incubação (20 e 40 minutos) neste trabalho endereça uma variável física frequentemente subtestada, provando que a "falha" de um composto pode ser, na verdade, um desajuste espectral ou temporal e não uma ineficiência química.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar derivado de bacterioclorina e realizar uma avaliação comparativa de sua eficácia fotodinâmica contra *Staphylococcus aureus* considerando diferentes tempos de incubação pré-irradiação e diferentes tipos de irradiação espectral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Extrair bacterioclorofila-*a* a partir da biomassa de *Rhodopseudomonas faecalis*;

Avaliar a inativação fotodinâmica *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* sob dois tempos de incubação pré-irradiação diferentes (20 e 40 minutos);

Comparar a eficácia de irradiação em dois comprimentos de onda distintos (760 e 780 nm);

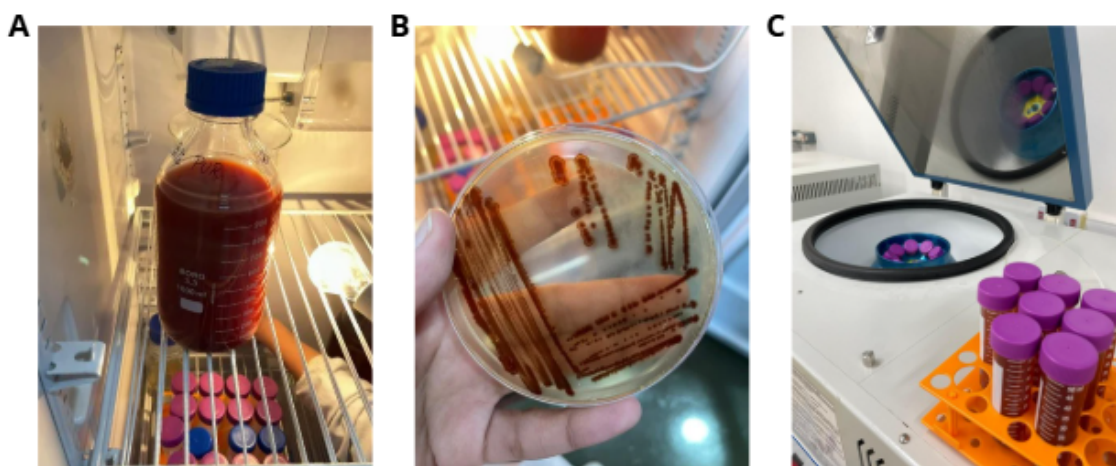
Analisar a eficiência das variáveis em relação a fotoinativação do microrganismo *Staphylococcus aureus* determinando a redução logarítmica de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DE BACTERIOCLORINA

A bacterioclorina foi produzida a partir da bacterioclorofila-*a* extraída da biomassa da bactéria *Rhodopseudomonas faecalis* cultivada em laboratório conforme metodologia descrita na literatura. A cultura foi realizada em frascos de reagentes de 1 L, previamente autoclavados, em BOD sob temperatura controlada de 37 °C e com iluminação contínua de uma lâmpada halógena amarela de 100 W. O período de incubação variou entre 7 e 21 dias, confirmando-se o crescimento visualmente pela aquisição de uma cor roxa intensa pelo meio (Figura 7). Ao final do cultivo, a biomassa bacteriana foi colhida por centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos a 10 °C e, em seguida, liofilizada para ser utilizada nos procedimentos subsequentes (BILHA, 2025) (DA CRUZ RODRIGUES, 2024).

Figura 7. Cultivo de *Rhodopseudomonas faecalis*. A) Cultura realizada em frascos de 1 L em incubadora BOD; B) Cultivo bacteriano em placa de Petri para confirmação da morfologia bacteriana. C) Centrifugação da biomassa bacteriana.

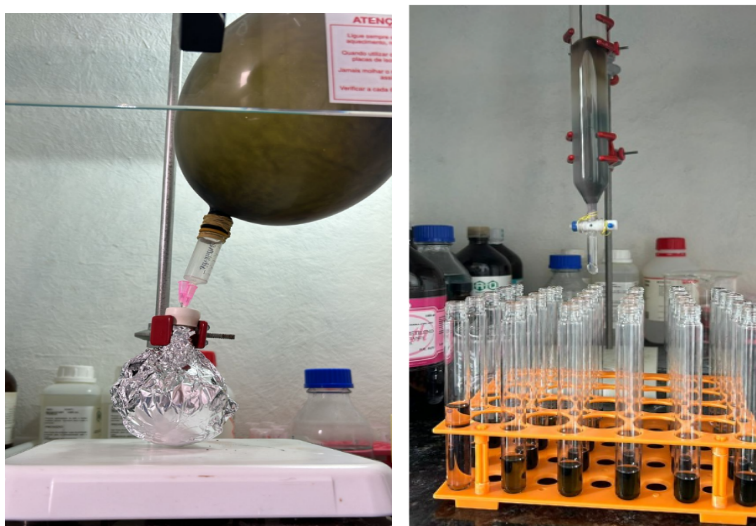


Fonte: Autoria própria, 2024.

O processo de extração da bacterioclorina também foi realizado conforme as metodologias de Bilha (2025) e Da Cruz Rodrigues *et al.* (2024), iniciando-se com um tratamento de solução metanol/H₂SO₄ a 10% (Figura 7).

A bacterioclorina fitil foi purificada por meio de cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando uma mistura de diclorometano e metanol (9.5:0.5) como eluente (Figura 8). Assim, obteve-se a Bacterioclorina Fitil (Bchl-F), que foi acondicionada a -20 °C protegidas de luz, devido à sua fotossensibilidade.

Figura 8. A) Extração da bacterioclorina sob atmosfera de argônio; B) Cromatografia em coluna de sílica gel para extração da bacterioclorina fitil.



Fonte: Autoria própria, 2025.

4.2 FOTOINATIVAÇÃO MICROBIANA

O microrganismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 485) foi cultivado em caldo BHI (*Brain-Heart-Infusion*) a 37 °C *overnight*. Antes da incubação, a cultura foi centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm para a formação de um *pellet*, que foi, então, ressuspensionado em PBS (solução salina tamponada com fosfato). A densidade óptica (DO) das suspensões foi ajustada para 0.1 a 600 nm em um espectrofotômetro, garantindo uma concentração celular inicial de aproximadamente 10^7 células/mL para os ensaios de fotoinativação (BILHA, 2025) (DA CRUZ RODRIGUES, 2024). A solução contendo o microrganismo foi adicionada em uma placa de 24 poços (500 µL cada poço).

A Bacterioclorina Fitil que foi o fotossensibilizador utilizado neste estudo, foi inicialmente dissolvida em 200 µL de DMSO e após adicionados 800 µL de

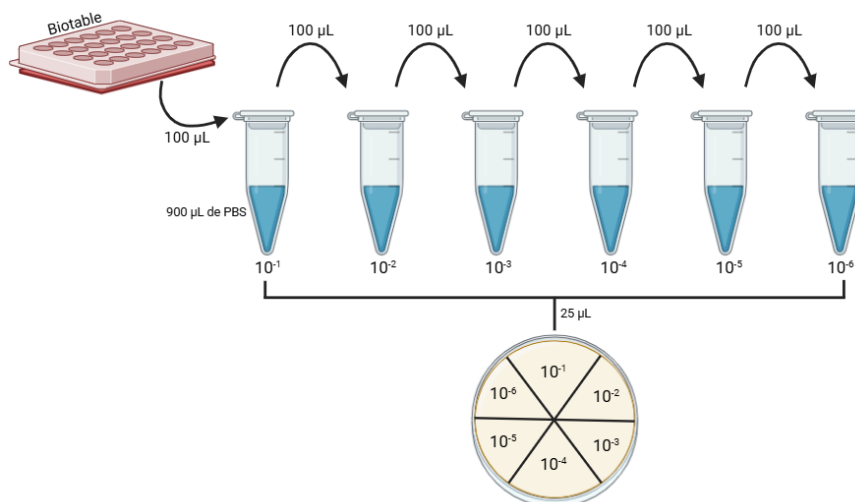
PBS. As soluções foram diluídas para obter as concentrações utilizadas no estudo (1; 10; 100 e 200 μ M).

Os grupos controles foram compostos por: “*S. aureus*”, contendo somente o microrganismo a fim de avaliar somente o crescimento do microrganismo; Os grupos “760 nm” e “780 nm” corresponderam ao microrganismo irradiado com os diferentes tipos de luz utilizados neste estudo, para determinar se a luz influencia no crescimento do microrganismo; Grupos controles com o fotossensibilizador na sua concentração máxima com diferentes tempos de incubação, “10 μ M, 20 minutos” e “10 μ M, 40 minutos” □ este grupo não recebeu luz, a fim de se analisar a toxicidade do fotossensibilizador no escuro, nos diferentes tempos de incubação.

Os grupos de tratamento de fotoinativação contiveram 500 μ L de microrganismo em PBS e o fotossensibilizador nas respectivas concentrações. O tempo de incubação pré-irradiação de 20 ou 40 minutos do FS também foi realizado conforme as determinações de grupos de tratamento. E, após este período, as placas de 24 poços foram irradiadas com fontes de luz de comprimentos de onda diferentes (760 e 780 nm) a 30 e 45 J/cm².

Tanto os grupos controles quanto os grupos de tratamento foram feitos em triplicata. Após a conclusão desta primeira etapa, foram coletados 100 μ L de cada poço, seguidamente transferidos para tubos Eppendorf contendo 900 μ L de PBS, e submetidos a 6 diluições em série, conforme Figura 9. Durante o experimento, os grupos foram mantidos no escuro, isolados da luz por papel alumínio, evitando a intervenção da luz do laboratório nos experimentos. Em sequência, iniciou-se a inoculação de 25 μ L de cada grupo em placa de Petri, contendo meio BHI, dividida em seis porções (uma para cada diluição), e esta etapa foi realizada em duplicata. Ao final do plaqueamento, incubou-se a 37 °C por 24 horas em estufa de BOD para a contagem das unidades formadoras de colônias (BILHA, 2025) (DA CRUZ RODRIGUES, 2024).

Figura 9. Esquema da metodologia da TFD e plaqueamento.



Fonte: Autoria própria, 2025.

4.3 FONTE DE ILUMINAÇÃO

Foram utilizadas duas fontes de iluminação contendo LED, uma em 760 nm e outra em 780 nm conforme demonstrado nas Figura 10 e Figura 11. Uma vez que a intensidade das fontes de irradiação são diferentes, é necessário iluminar por tempos diferentes a fim de obter a mesma dose de luz. Para a Biotable com comprimento de onda de 780 nm, foram irradiados os poços durante 21 e 31 minutos para obter as doses de luz de 30 J/cm^2 e 45 J/cm^2 respectivamente. Já para a fonte de iluminação de 760 nm (Biolambda), foram irradiados 48 e 75 minutos para obter 30 J/cm^2 e 45 J/cm^2 respectivamente.

Figura 10. Equipamento Biolambda - irradiação com LED em 760 nm.



Fonte: Autoria própria, 2025

Figura 11. Equipamento Biotable- irradiação com LED em 780 nm.

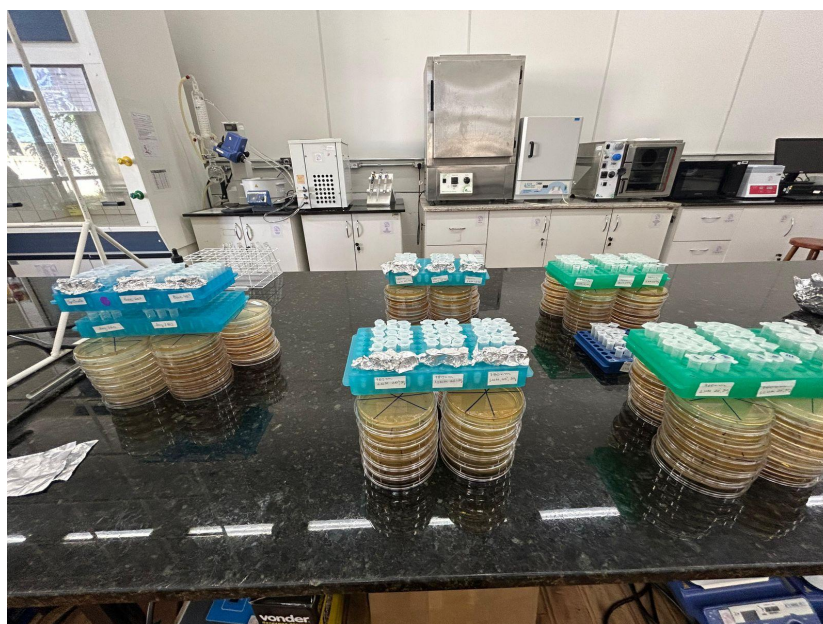


Fonte: Autoria própria, 2025.

4.4 PREPARO DOS ENSAIOS DE FOTOINATIVAÇÃO

Antes da realização do experimento, foi preparado o material, o que inclui as placas com Ágar-BHI e preparação dos eppendorfs com solução de PBS conforme Figura 12.

Figura 12. Material utilizado para cada ensaio de fotoinativação.



Fonte: Autoria própria, 2025.

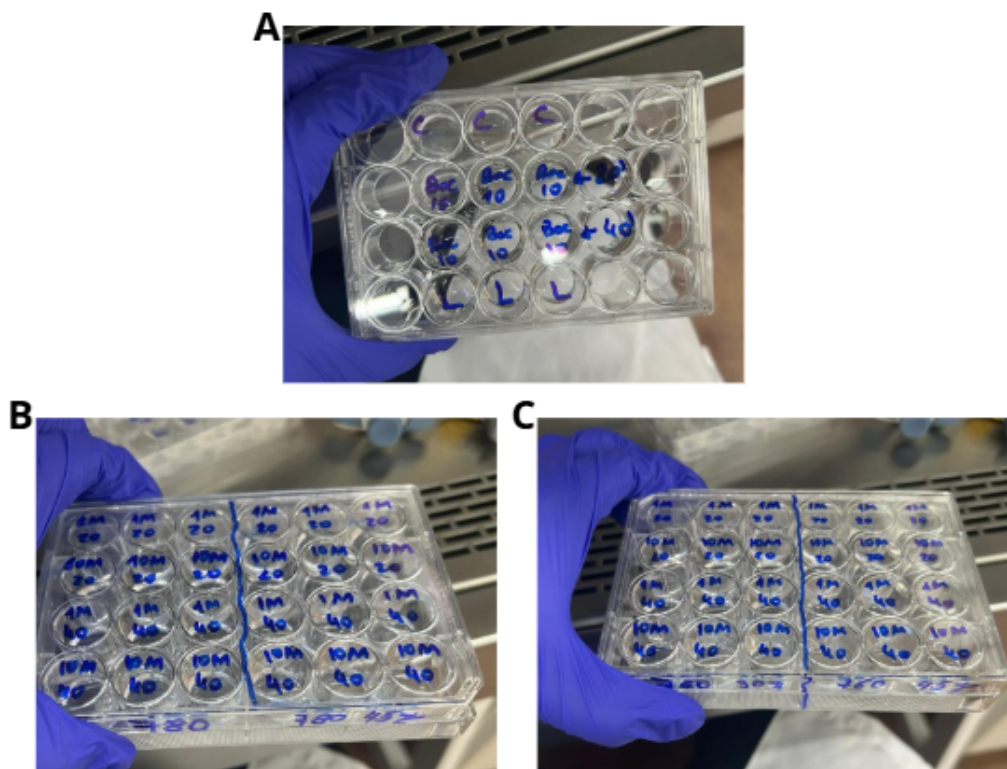
Para estabelecer as variáveis analisadas, revisou-se os protocolos descritos na literatura, notando-se que a grande maioria dos procedimentos estabelecem 20 minutos de incubação pré-irradiação e utilizam doses de luz no comprimento de onda de 780 nm. Assim, determinou-se a realização dos testes de inativação microbiana com tempos de 20 e 40 minutos de incubação (20' e 40') e dois comprimentos de onda diferentes (760 e 780 nm).

O ensaio de fotoinativação com Bchl-F foi realizado inicialmente com duas concentrações diferentes (1 μM e 10 μM), sob duas doses de luz de 30 J/cm^2 e 45 J/cm^2 .

Após o ajuste da DO da *S. aureus*, preparou-se as soluções do fotossensibilizador fitil, dissolvendo-o primeiramente em DMSO e, em seguida, diluído em PBS até as concentrações de 1 e 10 μM . Em placas de 24 poços, 500 μL da suspensão microbiana foram adicionados a cada poço. A configuração experimental incluiu controles (microrganismo sem tratamento; toxicidade no escuro para 20 minutos; toxicidade no escuro para 40 minutos; irradiação de 45 J/cm^2 a 760 nm; e irradiação de 45 J/cm^2 a 780 nm) e os

grupos de tratamento, em que cada concentração foi irradiada com doses de 30 J/cm² e 45 J/cm², tanto na Biolambda quanto na Biotable (Figura 15).

Figura 13. Placas de 24 poços com o delineamento experimental do ensaio de fotoinativação com Bchl-F. A) Placa com grupos controle; B) Placa com grupos de tratamento submetidos a 760 nm; C) Placa com grupos submetidos a 780 nm.



Fonte: Autoria própria, 2025.

As placas foram incubadas por 20 e 40 minutos no escuro, permitindo a adsorção e internalização do fotossensibilizador na estrutura bacteriana. Logo após, as placas de grupos de tratamento foram colocadas em suas respectivas irradiações para receberem a dose de luz equivalente a 30 J/cm² e, seguidamente, 45 J/cm².

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação estatística dos resultados quantitativos, os dados brutos de contagem das unidades formadoras de colônias foram primeiramente convertidos em logaritmo na base 10 (log UFC/mL). A redução logarítmica correspondente à

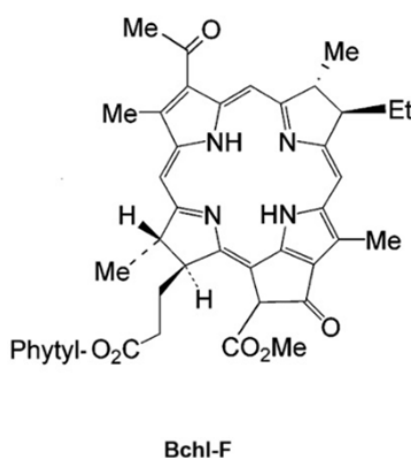
magnitude da fotoinativação foi calculada subtraindo-se o valor logarítmico dos grupos submetidos aos tratamentos do valor do respectivo controle experimental.

A análise do efeito isolado da concentração da Bacterioclorina Fitol (Bchl-F) sobre a viabilidade celular foi conduzida por meio da Análise de Variância de fator único (*One-way* ANOVA), seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey HSD. Para avaliar de forma integrada o impacto das variáveis de processo físico — comprimento de onda (760 nm e 780 nm), dose de luz (30 e 45 J/cm²) e tempo de incubação (20 e 40 minutos) —, aplicou-se uma ANOVA fatorial de três vias (*Three-way* ANOVA), processada separadamente dentro de cada limiar de concentração. Adicionalmente, testes *t* de uma amostra foram executados para comparar a redução de cada grupo de tratamento contra a ausência de efeito (controle), empregando-se a rigorosa correção de Holm-Bonferroni para o ajuste de comparações múltiplas e mitigação de falsos positivos. O nível de significância α adotado para todas as análises inferenciais foi de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para realizar uma fotoinativação ou Terapia Fotodinâmica, é necessário um fotossensibilizador. Sendo assim, foi obtido a bacterioclorina Fitol (Figura 12), proveniente da bactéria *Rhodopseudomonas faecalis* cultivada em laboratório conforme metodologia descrita na literatura (BILHA, 2025) (DA CRUZ RODRIGUES, 2024).

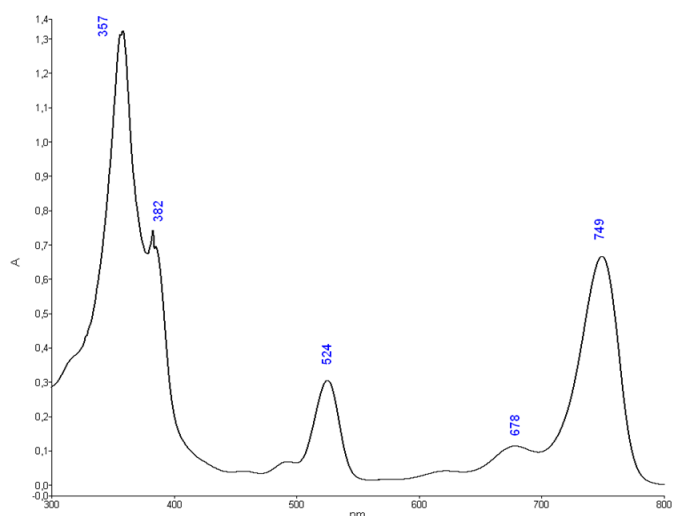
Figura 14. Estrutura da Bacterioclorina Fitol (Bchl-F).



Fonte: Autoria própria, 2025.

Este fotossensibilizador foi selecionado, pois é obtido facilmente, sem a necessidade de modificações estruturais, por ter uma absorção na região de aproximadamente 750 nm (conforme Figura 15) e além disso é uma classe de fotossensibilizadores estudados pelo grupo de pesquisa.

Figura 15. Espectro de absorção da Bacterioclorina Fitol.

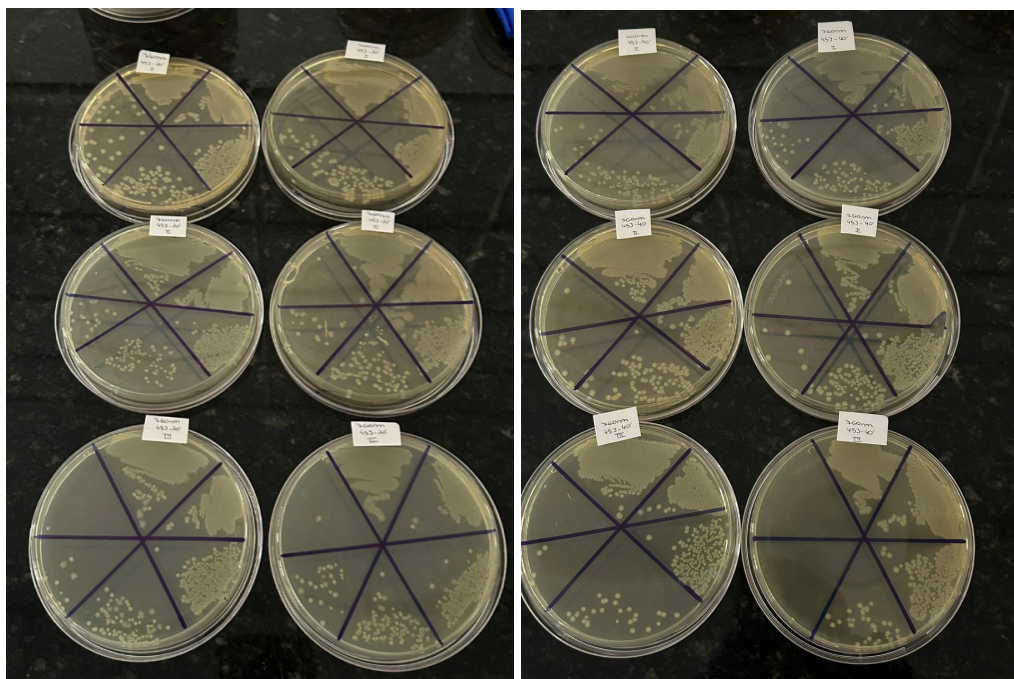


Fonte: Autoria própria, 2025.

Após a obtenção do fotossensibilizador, foi estabelecido que seria investigado o tempo de incubação e também seria avaliado o tipo de iluminação. Então, foi selecionada a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* como organismo padrão para todos os testes realizados neste trabalho. A escolha é justificada pela estrutura deste tipo de bactéria, que, ao contrário de bactérias Gram-negativas, não apresenta a membrana externa de lipopolissacarídeos, contendo apenas uma camada espessa e complexa de peptidoglicano externa à membrana plasmática. Desta forma, a análise das variáveis críticas não foi influenciada pelas barreiras da estrutura bacteriana.

Para quantificar o efeito do tratamento, amostras de cada poço foram coletadas e submetidas a seis diluições em série, seguidas de semeadura em placas de meio de cultura sólido (BHI) divididas em seis partes. Cada condição experimental foi realizada em triplicata a fim de garantir a precisão e a reprodutibilidade dos resultados. Após um período de incubação de 24 horas, contou-se a quantidade de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) em cada placa (Figura 16).

Figura 16. Contagem de UFCs de grupos de tratamento com fotossensibilizador Bchl-F.

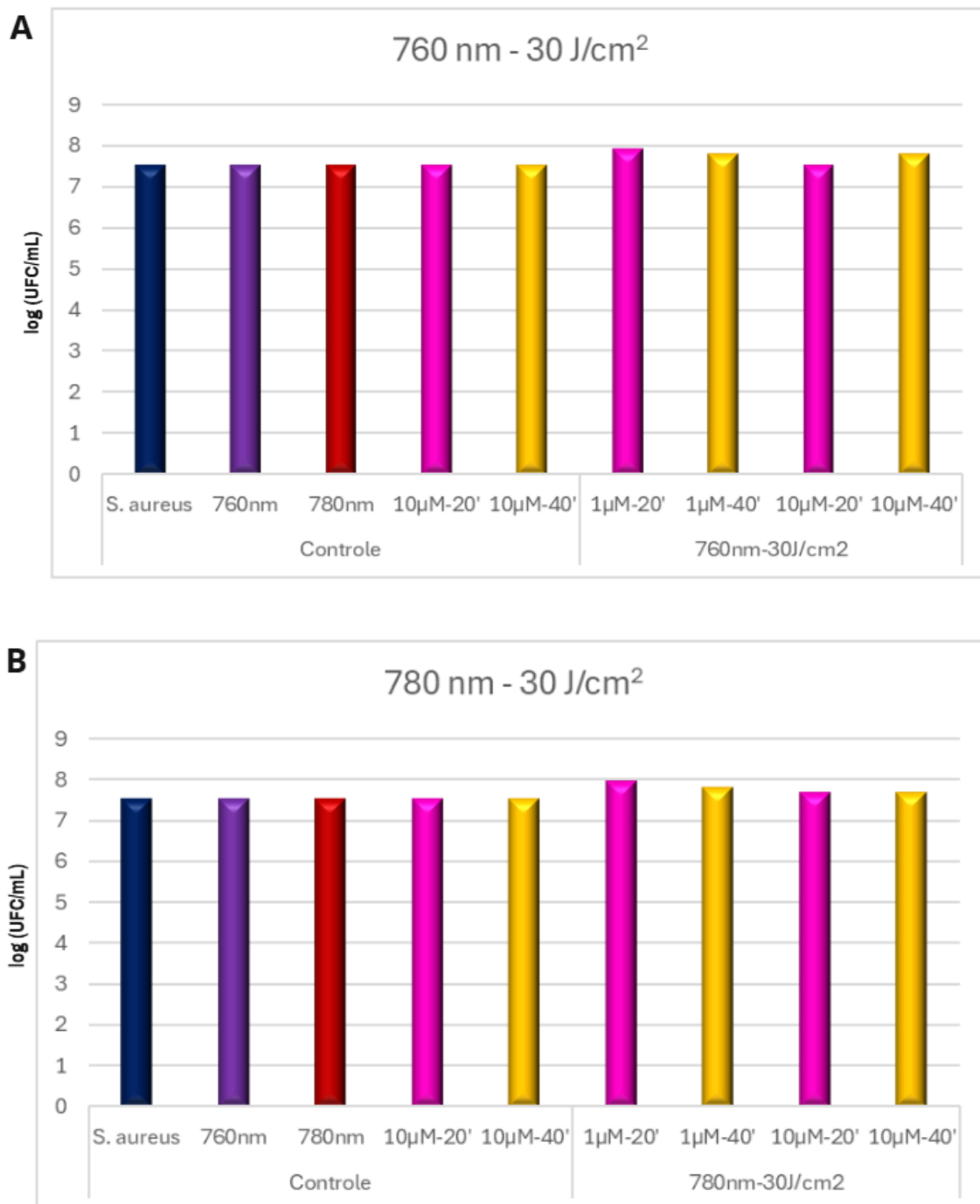


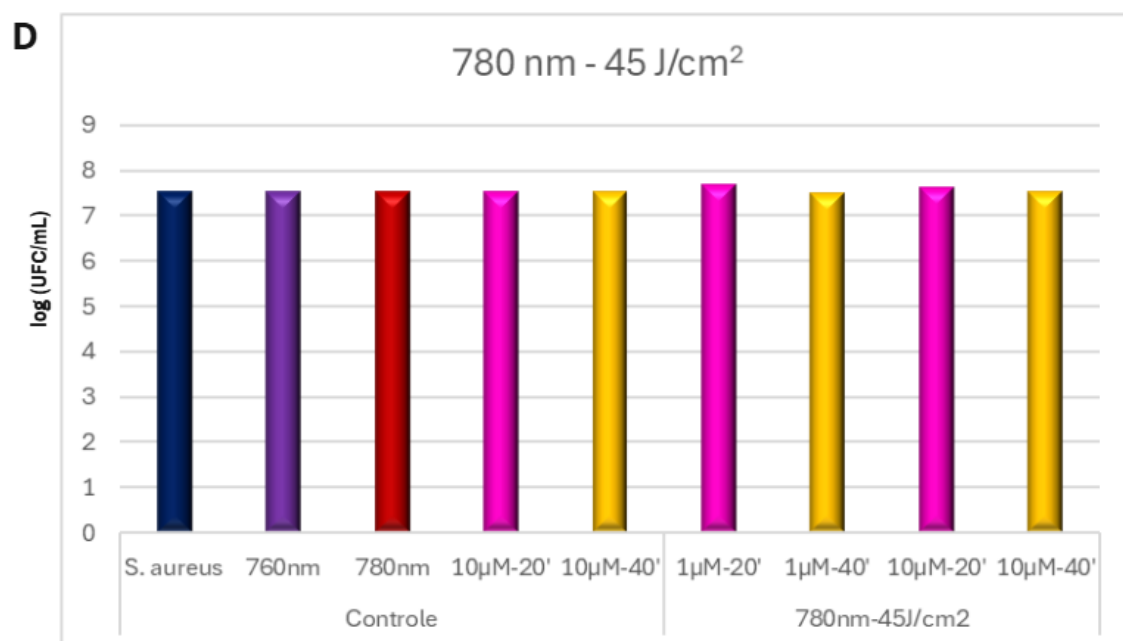
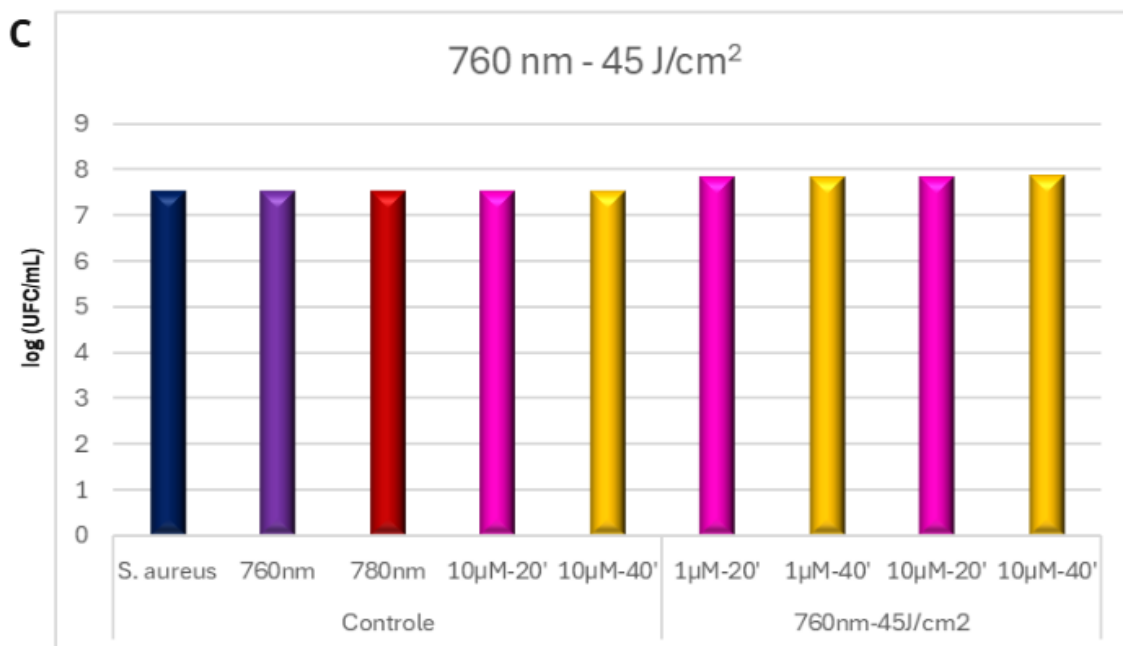
Fonte: Autoria própria, 2025.

A eficácia da inativação fotodinâmica foi calculada a partir do número de UFC por mililitro (UFC/mL), levando em consideração o fator de diluição. O valor final plotado no eixo Y do gráfico foi o logaritmo deste resultado (Log UFC/mL). Estes dados foram então projetados nos gráficos 1A, 1B, 1C e 1D, em que podemos observar nas primeiras barras tem se representado o grupo controle. O grupo “*S. aureus*” contém somente o microrganismo em PBS, com a finalidade de monitorar o crescimento do microrganismo sem nenhuma interferência de FS e de luz. Na segunda e terceira barra dos gráficos, têm-se os grupos controles denominados “760 nm” e “780 nm”, os quais representam o microrganismo irradiado com estes comprimentos de onda em 45 J/cm², visando investigar se a luz nestes comprimentos de onda afeta o crescimento do microrganismo. A quarta e quinta barra do controle, denominadas “10 µM 20” e “10 µM 40”, contêm o fotossensibilizador Bacterioclorina Fitol, na dose de 10 µM nos tempos de incubação de 20 e 40 minutos; estes grupos foram incubados no escuro e têm por finalidade avaliar se o fotossensibilizador é

tóxico nesta concentração (sem a presença de luz) e se o tempo de incubação interfere no crescimento do microrganismo.

Gráfico 1. Inativação fotodinâmica com Bacterioclorina Fitil a 1 e 10 μM .





Fonte: Autoria própria, 2025.

Após a análise dos gráficos 1A, 1B, 1C e 1D, pode-se concluir que o microrganismo teve um crescimento de 7,5 log (UFC/mL) e que a fonte de iluminação de 760 nm e 780 nm tanto em 30 quanto em 45 J/cm² não afetam o crescimento do microrganismo. Também se observa que o fotossensibilizador na concentração testada não é tóxico e nos tempos de incubação não afetam o crescimento do microrganismo, pois todos os grupos controles se mantiveram

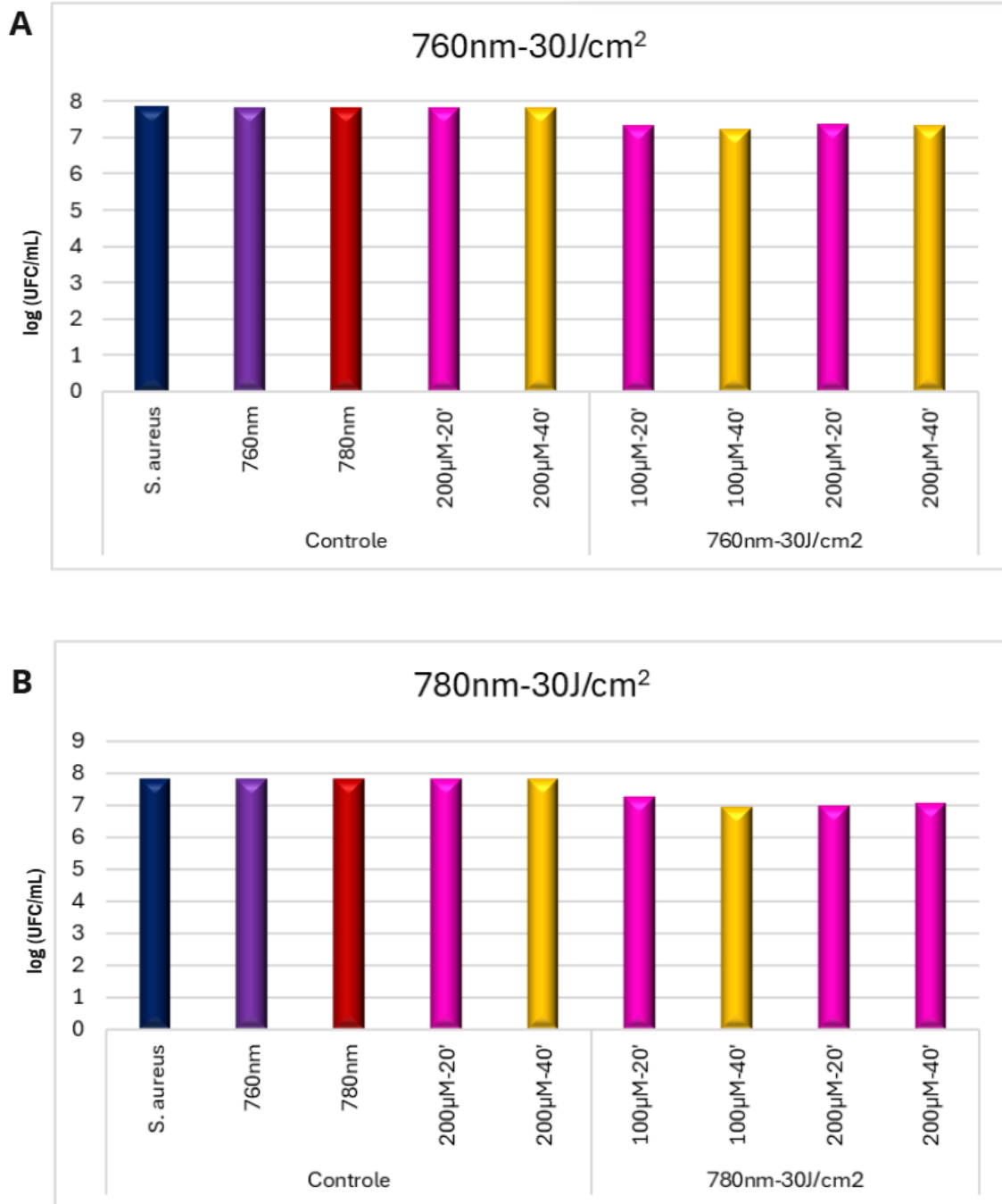
em torno de 7,5 log (UFC/mL), evidenciando, mais uma vez, que somente a luz, ou somente o fotossensibilizador não causam inativação fotodinâmica do microrganismo.

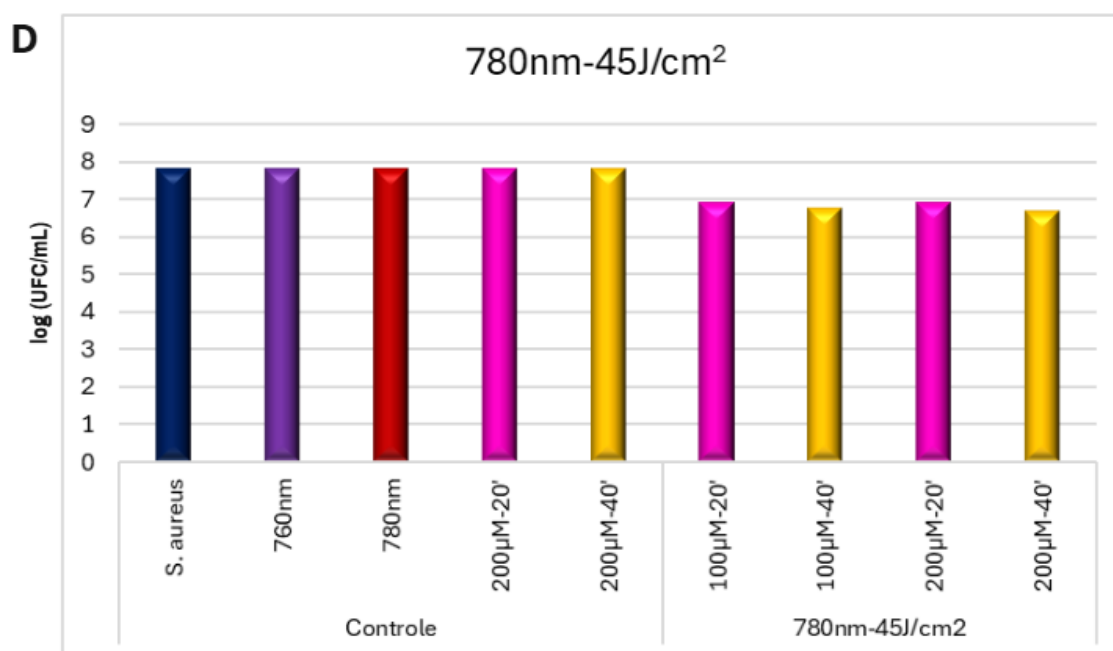
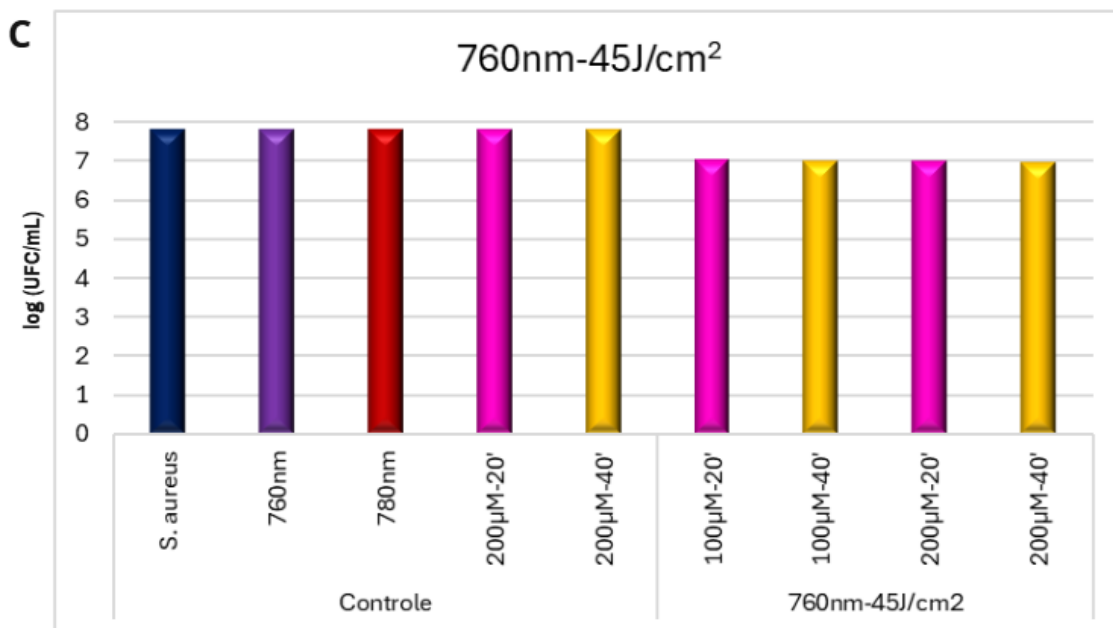
Nos gráficos 1A e 1C, quando analisamos os grupos de fotoinativação, em que os microrganismos foram incubados com a bacterioclorina fitil nas concentrações de 1 e 10 μM com os tempos de incubação de 20 e 40 minutos, com as doses de luz de 30 e 45 J/cm^2 com a fonte de iluminação de 760 nm, observamos que não ocorreu diminuição de microrganismos. O mesmo acontece nos gráficos 1B e 1D, onde a fonte de iluminação foi de 780 nm.

A principal razão para a ineficácia da Bchl-F reside, muito provavelmente, na sua estrutura química, pois a cadeia fitil torna a molécula menos hidrofílica, dificultando sua penetração no interior do microrganismo. E, quando uma molécula altamente hidrofóbica como a Bchl-F é introduzida em um ambiente aquoso salino (como o PBS), a tendência termodinâmica imediata é a formação de agregados moleculares ou precipitados para minimizar a exposição da parte hidrofóbica à água. Em um agregado, as moléculas de fotossensibilizador estão empacotadas muito próximas umas às outras. Ao absorverem a luz (seja 760 ou 780 nm), a energia de excitação é dissipada rapidamente através de conversão interna (calor) devido às interações intermoleculares, em vez de realizar o cruzamento intersistema para o estado tripleto. Consequentemente, a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) é drasticamente reduzida (BILHA, 2025).

A fim de se obter melhores resultados, a concentração do fotossensibilizador foi aumentada para 100 e 200 μM , mantendo o tempo de incubação de 20 e 40 minutos, com as doses de luz de 30 e 45 J/cm^2 . Realizou-se o mesmo protocolo do experimento das concentrações anteriores, e os respectivos resultados estão representados nos gráficos 2A, 2B, 2C e 2D.

Gráfico 2. Inativação fotodinâmica com Bacterioclorina Fitol a 100 e 200 μM .





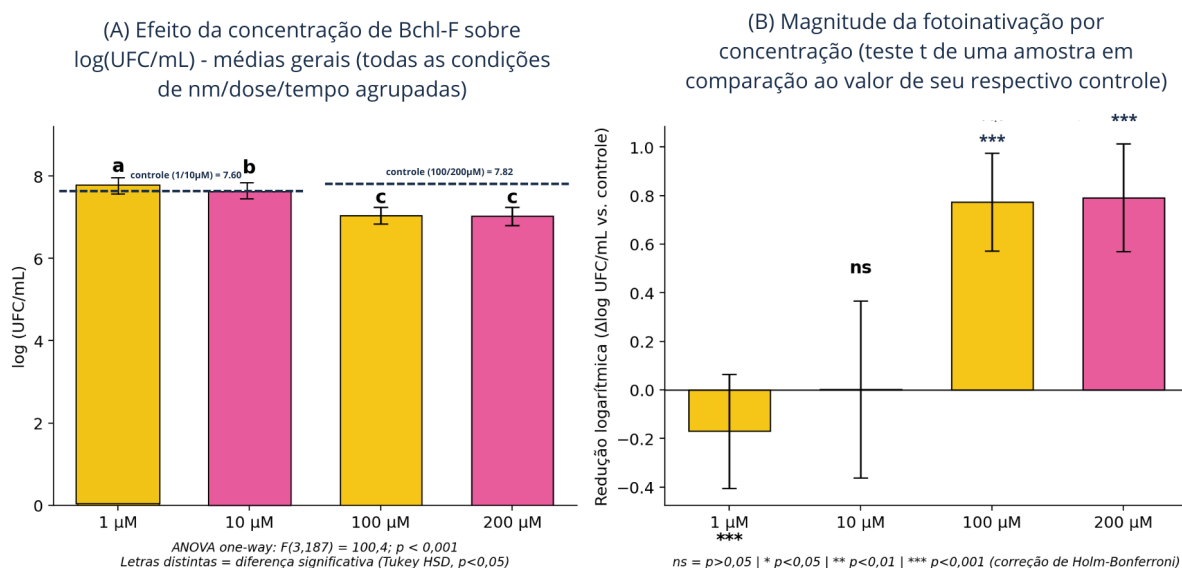
Fonte: Autoria própria, 2025.

Ao analisar os gráficos 2A, 2B, 2C e 2D, pode-se observar os grupos controles próximos a 8 logs, tal que todos os controles apresentaram o mesmo comportamento de crescimento do microrganismo, mostrando mais uma vez que apenas a luz não interfere no crescimento do microrganismo. Ademais, o fotossensibilizador avaliado também não é tóxico na concentração de 200 µM, e os tempos de incubação não interferiram no crescimento do microrganismo.

A análise dos resultados da Bacterioclorina Fitol nas concentrações de 100 e 200 μM , com as fontes de iluminação de 30 e 45 J/cm^2 mostraram uma redução de aproximadamente 1 log. Com estes resultados, podemos concluir que as duas fontes de iluminação em 760 nm e 780 nm, não apresentam diferença considerável na redução dos microrganismos em ambas as doses de luz (30 e 45 J/cm^2), pois, ainda que uma das fontes de iluminação seja um sistema aberto (Biotable) e a outra fonte um sistema fechado (Biolambda), a inativação foi de aproximadamente 1 log. No que se refere ao tempo de incubação do fotossensibilizador, de 20 e 40 minutos ambas reduzem aproximadamente 1 log.

A quantificação do efeito fotodinâmico e a influência direta das variáveis de processo foram validadas por meio de análise estatística. O fator determinante para a eficácia do tratamento foi, de fato, a concentração do fotossensibilizador, conforme apresentado no Gráfico 3. A Análise de Variância (ANOVA one-way) revelou um efeito principal altamente significativo atrelado à dosagem da Bchl-F ($F = 100,4$; $p < 0,001$). O pós-teste de Tukey confirmou estatisticamente que as concentrações de 1 μM e 10 μM não diferiram do grupo controle, comprovando a ausência de inativação fotodinâmica nessas condições. Em contrapartida, as doses de 100 μM e 200 μM promoveram uma redução estatisticamente superior (média de $\sim 0,78 \log$; $p < 10^{-28}$). Constatou-se também que não há diferença significativa de letalidade entre 100 μM e 200 μM ($p = 0,99$), evidenciando um nítido platô na eficácia de penetração e ação da molécula sob as condições avaliadas.

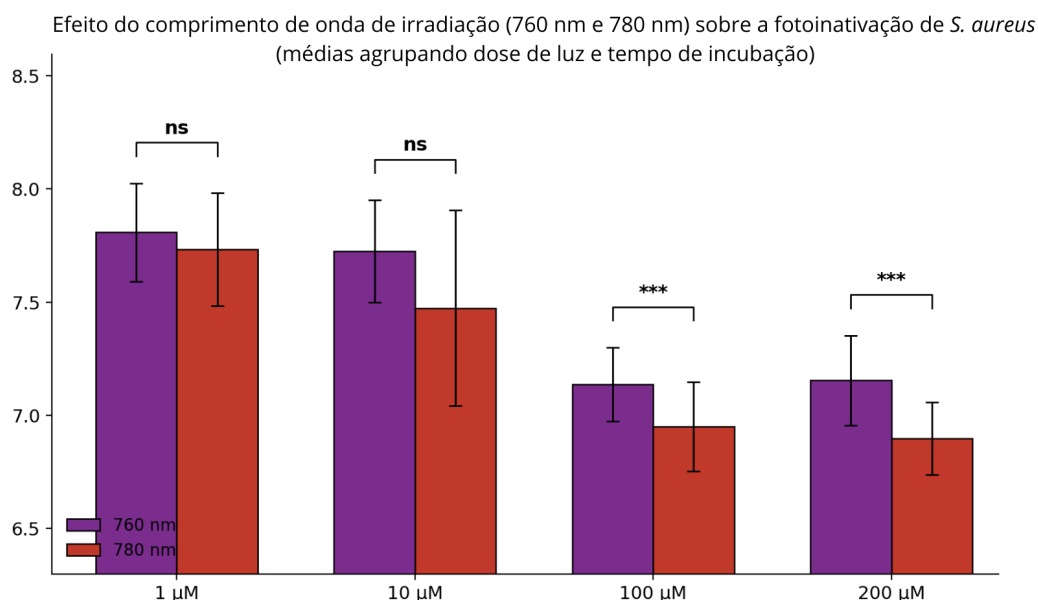
Gráfico 3. (A) Efeito da concentração de Bchl-F sobre log(UFC/mL) em que as médias gerais incluem todas as condições de luz, dose e tempo agrupadas.



Fonte: Autoria própria, 2025.

Quanto ao comprimento de onda da irradiação, os resultados do Gráfico 4 demonstram que em baixas concentrações (1 e 10 μM) a variação espectral entre 760 nm e 780 nm não gera impactos detectáveis. Contudo, a estatística aplicada às concentrações ativas (100 e 200 μM) revelou que, embora a redução absoluta se mantenha próxima a 1 log, existem diferenças significativas de pequena magnitude (0,1 a 0,3 log) favorecendo pontualmente uma ativação mais responsiva dependendo da correspondência espectral com as bandas da bacterioclorina.

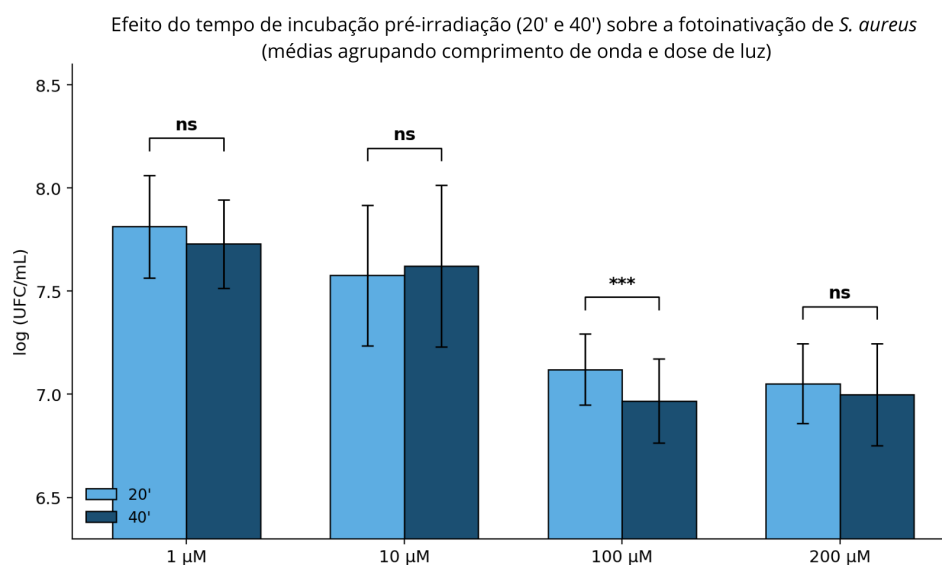
Gráfico 4. Efeito do comprimento de onda de irradiação (760 nm e 780 nm) sobre a fotoinativação de *S. aureus* representado por médias agrupadas de dose de luz e tempo de incubação.



Fonte: Autoria própria, 2025.

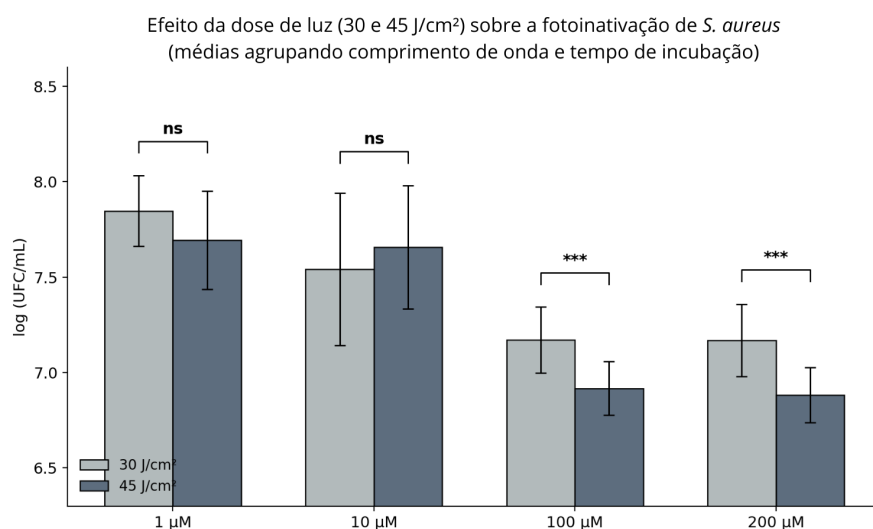
A avaliação do tempo de contato pré-irradiação, indicada no Gráfico 5, validou quantitativamente que os tempos de 20 e 40 minutos não apresentam diferença de grande magnitude. Essa constatação fortalece e justifica o protocolo padrão de incubação de 20 minutos frequentemente empregado na literatura para ensaios fotodinâmicos *in vitro* com esse perfil de microrganismo, provando ser o tempo suficiente para a adsorção do composto nas camadas de peptidoglicano do *S. aureus*. A dinâmica relacionada à densidade de energia da luz acompanhou esse mesmo perfil, conforme o Gráfico 6, em que as doses de 30 e 45 J/cm² geraram eficiências próximas.

Gráfico 5. Efeito do tempo de incubação pré-irradiação (20 e 40 minutos) sobre a fotoinativação de *S. aureus* representado por médias agrupando comprimento de onda e dose de luz.



Fonte: Autoria própria, 2025.

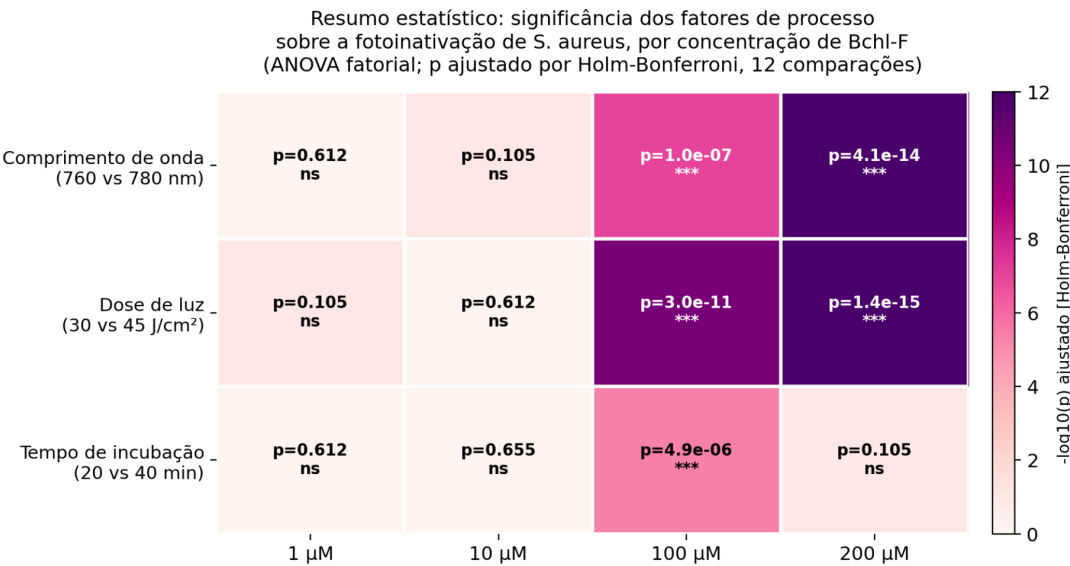
Gráfico 6. Efeito da dose de luz (30 e 45 J/cm²) sobre a fotoinativação de *S. aureus* representado por médias agrupando comprimento de onda e tempo de incubação.



Fonte: Autoria própria, 2025.

O panorama completo da significância de todos esses fatores de fotoinativação (comprimento de onda, dose de luz e tempo de incubação) encontra-se consolidado no mapa de calor das probabilidades (Gráfico 7). Após os ajustes conservadores de Holm-Bonferroni, fica evidente que as variáveis físicas e temporais do tratamento apenas exercem um papel de modulação significativo quando a concentração do fotossensibilizador supera o seu limiar inativo (acima de 10 µM), momento no qual a interação sinérgica entre luz, molécula e tempo se torna otimizada para o dano oxidativo celular.

Gráfico 7. Mapa de Calor do resumo estatístico.



Fonte: Autoria própria, 2025.

Assim, adiciona-se que aumentar a dose do FS e a dose de luz a fim de inativar completamente o microrganismos seria uma alternativa. No entanto, o objetivo do trabalho consistiu em investigar os efeitos do tempo de incubação e também o efeito da fonte de iluminação, que pode ser analisado quando ainda se tem o crescimento do microrganismo. Este estudo contribuiu para as pesquisas realizadas no Grupo de Pesquisa de Terapia Fotodinâmica, pois se concluiu que o tempo de incubação de 20 minutos utilizados em outros estudos, é um tempo de incubação adequado para esta classe de compostos (ULIANA *et al*, 2014) (BILHA, 2025).

Além disso, as duas fontes de iluminação presentes no laboratório apresentam eficiência muito similar para este composto derivado de

bacterioclorina. Assim, pode-se ampliar a quantidade de fotossensibilizadores que apresentam banda de absorção acima de 780nm, pois certamente a fonte de iluminação irá promover a ativação destes compostos, bem como, podemos trabalhar com bacterioclorinas complexadas com metal, as quais apresentam um deslocamento das bandas Q e que possivelmente serão ativadas também por estas fontes de iluminação (HAMBLIN; ABRAHAMSE, 2018) (HUANG, *et al.*, 2017).

Este entendimento dos fatores que podem afetar a TFD, contribuiu para a pesquisa, uma vez que auxiliou no entendimento de como se dá a TFD e conseqüentemente, investigando cada vez mais diferentes tipos de fotossensibilizadores que possam inativar microrganismos resistentes a antibióticos, contribuindo com o bem-estar da sociedade.

6 CONCLUSÕES

O estudo atingiu seu objetivo central ao sintetizar um derivado de bacterioclorina a partir da biomassa da bactéria *Rhodopseudomonas faecalis* e avaliar seu potencial na inativação fotodinâmica de *Staphylococcus aureus*. A investigação permitiu concluir que a extração direta da Bacterioclorina Fitil (Bchl-F), sem alterações químicas adicionais, resulta em uma eficácia fotodinâmica limitada. Nos ensaios realizados, a Bchl-F não apresentou atividade de inativação nas concentrações baixas de 1 e 10 μM e, mesmo quando as concentrações foram elevadas para 100 e 200 μM , a redução da viabilidade celular foi modesta, limitando-se a aproximadamente 1 log em comparação aos grupos de controle.

A principal razão identificada para esse desempenho reduzido reside na estrutura química da molécula, especificamente na presença da cadeia fitil, que confere alta hidrofobicidade ao composto. Essa característica impede uma interação eficiente com a parede celular bacteriana em meios aquosos fisiológicos, como o PBS, levando à formação de agregados moleculares que dissipam a energia luminosa na forma de calor em vez de gerar as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) necessárias para a morte celular.

No que tange às variáveis de processo analisadas, concluiu-se que as duas fontes de iluminação testadas, com comprimentos de onda de 760 nm e 780 nm, podem ser utilizadas para esta classe de compostos, uma vez que não houve diferença significativa na inativação microbiana entre elas, independentemente da dose de luz aplicada (30 ou 45 J/cm^2). Isso indica que a banda de absorção da Bchl-F é suficientemente larga para ser ativada por diferentes fontes de luz de diodo (LED), um avanço prático para a

padronização e o desenvolvimento de dispositivos de aplicação clínica. Da mesma forma, os tempos de incubação pré-irradiação de 20 e 40 minutos não apresentaram resultados distintos para a Bchl-F, indicando que o tempo de 20 minutos, frequentemente citado na literatura, é adequado e suficiente para protocolos envolvendo compostos dessa natureza.

Como proposta para estudos futuros, é interessante investigar estes fatores de incubação e de fonte de iluminação para outros fotossensibilizadores, mais hidrofílicos e também realizar a investigação com outros microrganismos.

REFERÊNCIAS

AGOSTINIS, Patrizia et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250-281, 2011.

AMORIM, A. da S. **Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana - Aplicações de Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em Bactérias e Vírus**. Dissertação (Mestrado em Química Medicinal) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2022.

BABIC, M.; HUJER, A. M.; BONOMO, R. A. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. **Drug resistance updates**, v. 9, n. 3, p. 142-156, 2006.

BILHA, J. K. **Potencial biotecnológico de microrganismos na obtenção de bacterioclorinas para inativação fotodinâmica**. 2025.

BONNETT, R. Chemical aspects of photodynamic therapy. **Gordon and Breach Science Publishers**, Amsterdam, 2000.

CALVETE, Mário José F.; GOMES, Ana Teresa PC; MOURA, Nuno MM. Clorinas em Terapia Fotodinâmica—Síntese e aplicações. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 2, p. 92-103, 2009.

CHEN, Guangcun et al. Advanced near-infrared light for monitoring and modulating the spatiotemporal dynamics of cell functions in living systems. **Advanced science**, v. 7, n. 8, p. 1903783, 2020.

CIEPLIK, F. et al. Antimicrobial photodynamic therapy — what we know and what we don't. **Critical reviews in microbiology**, v. 44, n. 5, p. 571-589, 2018.

COSTA, L. D.; COSTA, J. I.; TOMÉ, A. C. Porphyrin macrocycle modification: Pyrrole ring-contracted or-expanded porphyrinoids. **Molecules**, v. 21, n.3, p. 320, 2016.

CRISTALDO, Y. C.; IRMÃO, M. O. S.; MATUO, R. O uso indiscriminado de antibióticos e sua relação com a resistência bacteriana. **Tópicos especiais em ciências da saúde: teoria, métodos e práticas**, v. 5, n. 1, p. 117-128, 2022.

DA CRUZ RODRIGUES, A. et al. Photoinactivation of microorganisms using bacteriochlorins as photosensitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 1139-1150, 2024.

DE MACÊDO, J. A. B. Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria de farmacêutica. **Revista Fármacos & Medicamentos**, v. 2, n. 7, p. 19-24, 2000.

DE OLIVEIRA, K. T. et al. Conceitos fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do tipo Porfirinas, clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 310-335, 2015.

FRACKOWIAK, D. The Jablonski diagram. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 2, n. 3, p. 399, 1988.

GARCIA, G. et al. Carbohydrate-conjugated porphyrin dimers: Synthesis and photobiological evaluation for a potential application in one-photon and two-photon photodynamic therapy. **Bioorganic & medical chemistry**, v. 21, n. 1, p. 153-165, 2013.

HAMBLIN, M. R.; ABRAHAMSE, H. Inorganic salts and antimicrobial photodynamic therapy: mechanistic conundrums?. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 3190, 2018.

HOARD, J. L.; SMITH, K. M. Porphyrins and metalloporphyrins. **by KM Smith, Elsevier, Amsterdam**, p. 317, 1975.

HOMEM-DE-MELLO, Paula et al. DESIGN BIOINSPIRADO DE CORANTES. **Química Nova**, v. 48, n. 3, p. e-20250047, 2024.

HUANG, L. et al. Potassium iodide potentiates broad-spectrum antimicrobial photodynamic inactivation using photofrin. **ACS infectious diseases**, v. 3, n. 4, p. 320-328, 2017.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock - 14ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

MORALES, A. P.; CALDAS, C. De volta à era pré-antibiótica: a busca emergencial por novos arcabouços. **Ciência e Cultura**, v. 62, n. 4, p. 14-16, 2010.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). PubChem Compound Summary for CID 88846811, Dihydroporphyrin. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dihydroporphyrin>. Acesso em 24 jul. 2025.

PASTERNAK, J. Biofilmes: um inimigo (in) visível. **Revista Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, v.1, n. 1, p. 36-38, 2009.

PRATAVIERA, S. et al. Photodynamic therapy with a new bacteriochlorin derivative: Characterization and in vitro studies. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.** v. 34, p. 102252-102260, 2021.

PRATES, R. A. et al. Parâmetros de irradiação influenciam na inativação de leveduras tratadas com terapia fotodinâmica. **Revista Brasileira De Física Médica**, 4(1), 53–57, 2015.

ROHATGI-MUKHERJEE, K. K. **Fundamentals of Photochemistry**. Michigan: John Wiley & Sons, 1978.

SERRA, R. et al. Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 13, n. 5, p. 605-613, 2015.

SILVA, R. A. D. et al. Resistência a Antimicrobianos: a formulação da resposta no âmbito da saúde global. **Saúde em debate**, v. 44, n. 126, p. 607-623, 2020.

ULIANA, M. P. et al. Photobiological characteristics of chlorophyll a derivatives as microbial PDT agents. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 13, n. 8, p. 1137-1145, 2014.

VANEGAS-MÚNERA, J. M.; JIMÉNEZ-QUICENO, J. N. Resistencia antimicrobiana en el siglo XXI: ¿hacia una era postantibiótica?. **Revista Facultad Nacional de Salud Pública**, v. 38, n. 1, 2020.