



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
TECNOLOGIA, INFRAESTRUTURA E  
TERRITÓRIO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
INTERDISCIPLINAR EM ENERGIA E  
SUSTENTABILIDADE**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MICRORGANISMOS NA OBTENÇÃO DE  
BACTERIOCLORINAS PARA A INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA.**

**JULIANA KAFKA BILHA**

Foz do Iguaçu

2025



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
TECNOLOGIA, INFRAESTRUTURA E  
TERRITÓRIO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
INTERDISCIPLINAR EM ENERGIA E  
SUSTENTABILIDADE**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MICRORGANISMOS NA OBTENÇÃO DE  
BACTERIOCLORINAS PARA A INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA.**

**JULIANA KAFKA BILHA**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade do Instituto Latino-Americano de Tecnologia, Infraestrutura e Território da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Energia e Sustentabilidade.

Área de concentração: Sustentabilidade

Orientadora: Prof.(a) Dr.(a) Marciana P. Uliana Machado

Co-orientador: Prof. Dr. Michel R. Z. Passarini

Foz do Iguaçu

2025

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação  
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - CENTRAL

B595p

Bilha, Juliana Kafka.

Potencial biotecnológico de microrganismos na obtenção de bacterioclorinas para a inativação fotodinâmica /  
Juliana Kafka Bilha. - Foz do Iguaçu, 2025.

81 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latino-Americano de  
Tecnologia, Infraestrutura e Território, Programa de Pós Graduação Interdisciplinar em Energia e  
Sustentabilidade. Foz do Iguaçu - PR, 2025.

Orientadora: Marciana Pierina Uliana Machado.

1. Fotoinativação. 2. Resistência bacteriana. 3. Catiônica. I. Machado, Marciana Pierina Uliana. II. Título.

CDU 60

# POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MICRORGANISMOS NA OBTENÇÃO DE BACTERIOCLORINAS PARA A INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA.

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade do Instituto Latino-Americano de Tecnologia, Infraestrutura e Território da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Energia e Sustentabilidade.

## BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



MARCIANA PIERINA ULIANA MACHADO  
Data: 24/04/2025 11:22:37-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Marciana P. Uliana Machado

UNILA

Documento assinado digitalmente



PAULA ANDREA JARAMILLO ARAUJO  
Data: 24/04/2025 11:39:05-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Paula Andrea Jaramillo Araujo

UNILA

Documento assinado digitalmente



CLOVIS WESLEY OLIVEIRA DE SOUZA  
Data: 25/04/2025 11:44:41-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof<sup>º</sup> Dr<sup>º</sup> Clovis Wesley Oliveira de Souza

UFSCar

Documento assinado digitalmente



SEBASTIAO PRATAVIEIRA  
Data: 25/04/2025 17:58:49-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof<sup>º</sup> Dr<sup>º</sup> Sebastião Pratavieira

IFSC-USP

Documento assinado digitalmente



KATE CRISTINA BLANCO  
Data: 28/04/2025 10:57:00-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Kate Cristina Blanco

IFSC-USP

Foz do Iguaçu, 14 de março de 2025.

Dedico esta tese ao meu pai, **Otaviano Bilha**, quem sempre me incentivou a estudar e seguir em frente. Agradeço por ter estado comigo durante esta jornada que não acaba por aqui. Seguiremos juntos meu pai! Para sempre! Obrigada!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos céus pela possibilidade alcançar meus objetivos.

Agradeço à minha orientadora, professora Dra. Marciana (UNILA) por toda dedicação e competência na realização deste trabalho, por estar sempre presente nos experimentos. E, principalmente por ter entendido e apoiado todas as vezes que precisei me ausentar.

Ao meu coorientador, professor Dr. Michel (UNILA) por ter cedido seu laboratório para a realização dos experimentos, por ter cedido amostras do laboratório e por ter trazido uma amostra especialmente para mim na sua última coleta no continente Antártico.

Ao professor Dr. Clóvis (UFSCar) por ter cedido as amostras de bactérias para extração das moléculas.

Ao LQBO-UFSCar pela utilização do equipamento de RNM.

Ao LEAM-UNILA e ao LATEPS-UNILA pela utilização de equipamentos.

Ao DELABEN-UNILA, pela utilização de espaços, materiais e equipamentos e a toda equipe de servidores que não mediram esforços para me ajudar nesses 4 anos de pesquisa e que seguraram “as pontas” durante meu afastamento! Obrigada a todos vocês!

Aos meus colegas de laboratório: Priscila por ter compartilhado comigo vários experimentos e angústias! Laura e Andrés por terem me auxiliado nos experimentos finais.

Agradeço às minhas amigas e comadres, Angela e Éverli por terem me escutado todas as vezes que precisei ser ouvida nesses 4 anos de dedicação a este trabalho. E aos meus amigos, Giseli, Meirieli e Fernando por estarem sempre presentes!

Aos meus filhos Andrei e Alice, que são minha razão de vida e fortaleza para os dias difíceis! Obrigada por serem tão compreensivos com minhas ausências. Obrigada também ao pai dos meus filhos, Sandonaid pelo apoio no cuidado com as crianças.

Ao meu companheiro Israel por ter aguentado firme nestes 4 anos de tanta chatice e reclamações.

Ao meu irmão Fabiano, por ter me ajudado no cuidado com meus filhos durante este período e por toda amizade da vida toda.

A minha mãe por ter se esforçado tanto para permitir meu acesso à educação e à cultura. Obrigada mãe por ser sempre refúgio e alimento em minha vida!

Ao meu pai por ter trabalho de sol a sol, por ter compartilhado comigo seu gosto pela leitura, e por ter estado tão perto nesses seus últimos meses de vida me ensinando sua última lição ao lutar pela sua saúde! Obrigada meu pai por sua companhia nesta jornada!

*No mistério do sem-fim  
equilibra-se um planeta.*

*E, no planeta, um jardim,  
e, no jardim, um canteiro;  
no canteiro uma violeta,  
e, sobre ela, o dia inteiro,*

*entre o planeta e o sem-fim,  
a asa de uma borboleta*

*Cecília Meireles*

BILHA, Juliana K. Potencial Biotecnológico de Microrganismos na obtenção de Bacterioclorinas para a Inativação Fotodinâmica. Data da defesa: 14 de março de 2025. Total de folhas: 82. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu.

## RESUMO

Os microrganismos podem ser fontes naturais de diversas moléculas com potencial biotecnológico para produção de compostos para aplicações clínicas e industriais trazendo soluções inovadoras e sustentáveis nessas áreas. A bacterioclorofila extraída de grupos de bactérias púrpuras não sulfurosas quando modificada estruturalmente pode originar o fotossensibilizador Bacterioclorina, que é utilizado em terapia fotodinâmica. A Terapia Fotodinâmica é uma reação fotoquímica que requer a presença de moléculas fotossensibilizadoras que, irradiadas com luz de um comprimento de onda específico, leva à geração de espécies reativas de oxigênio, através da excitação do oxigênio molecular e, conseqüentemente, resultam em morte celular. Tem sido utilizada para tratamento de infecções bacterianas e/ou fúngicas, exibindo vantagens se comparado a antibióticos, visto que diminui a resistência bacteriana neste tipo de terapia. Além disso, a terapia fotodinâmica tem mostrado eficiência tanto para bactérias Gram-positivas quanto para bactérias Gram-negativas. Para tanto, neste estudo, microrganismos pigmentados isolados de sedimentos de diferentes ambientes incluindo, chorume, fundo de lago e o ambiente Antártico, foram testados a fim de obter fotossensibilizadores naturais. Também foi produzida uma bacterioclorina catiônica (Bchl-Cat) obtida da extração da bacterioclorofila de *Rhodopseudomonas faecalis*. Bchl-Cat e uma bacterioclorina metóxi (Bchl-M) foram utilizadas para estudos de fotoinativação. Os resultados obtidos demonstram potencial biotecnológico de uma molécula extraída de bactéria de amostras de chorume. Além disso, a bacterioclorina catiônica (Bchl-Cat) inativou o microrganismo Gram-positivo, *Staphylococcus aureus*. Para *Pseudomonas aeruginosa* a inibição alcançou cerca de 3 logs na concentração de 100 µM de Bchl-Cat e dose de luz de 45 J/cm<sup>2</sup>. Em *Escherichia coli* a inibição foi cerca de 4 logs na concentração de 250 µM de Bchl-Cat e dose de luz de 45 J/cm<sup>2</sup>. Em *Salmonella typhimurium* a inibição de 5 logs na concentração de 250 µM de Bchl-Cat e doses de luz de 20, 30 e 45 J/cm<sup>2</sup>. Para a levedura *Candida albicans*, Bchl-Cat inibiu cerca de 3 logs na concentração de 100 µM e dose de luz de 45 J/cm<sup>2</sup>. Bchl-M conseguiu inibir cerca de 3 logs na concentração de 250 µM e doses de luz de 20, 30 e 45 J/cm<sup>2</sup> da levedura *Candida albicans*. Estes resultados são significativos e podem indicar inativação de bactérias Gram-negativas com fotossensibilizador catiônico. Estudos posteriores podem inserir mais grupamentos catiônicos na molécula a fim de aumentar sua capacidade de interação com a parede celular desses microrganismos.

**Palavras-chave:** Gram-positiva; Gram-negativa; levedura, fotoinativação; resistência bacteriana; catiônica.

BILHA, Juliana K. Potencial Biotecnológico de Microorganismos en la Obtención de Bacterioclorinas para la Inactivación Fotodinámica. Fecha de defensa: 14 de marzo de 2025. Hojas totales: 82. Tesis (Doctorado) – Universidad Federal de Integración Latinoamericana, Foz do Iguaçu.

## RESUMEN

Los microorganismos pueden ser fuentes naturales de diversas moléculas con potencial biotecnológico para producir compuestos para aplicaciones clínicas e industriales, aportando soluciones innovadoras y sostenibles en estas áreas. La bacterioclorofila extraída de grupos de bacterias moradas sin azufre, cuando se modifica estructuralmente, puede dar lugar al fotosensibilizador bacterioclorina, que se utiliza en terapia fotodinámica. La Terapia Fotodinámica es una reacción fotoquímica que requiere la presencia de moléculas fotosensibilizantes que, al ser irradiadas con luz de una longitud de onda específica, conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno, a través de la excitación del oxígeno molecular y, en consecuencia, resulta en la muerte celular. Se ha utilizado para tratar infecciones bacterianas y/o fúngicas, mostrando ventajas frente a los antibióticos, ya que en este tipo de terapia no se produce resistencia bacteriana. Además, se ha demostrado que la terapia fotodinámica es eficaz tanto para bacterias Grampositivas como Gramnegativas. Para ello, en este estudio se probaron microorganismos pigmentados aislados de sedimentos de ambientes cloacales, ambientes de fondo de lagos y ambiente antártico con el fin de obtener fotosensibilizadores naturales. También se produjo una bacterioclorina catiónica (Bchl-Cat) obtenida de la extracción de bacterioclorofila de *Rhodopseudomonas faecalis*. Se utilizaron Bchl-Cat y una bacterioclorina metoxi (Bchl-M) para estudios de fotoinactivación. Los resultados obtenidos demuestran el potencial biotecnológico de una molécula extraída de bacterias en muestras de lixiviados. Además, la bacterioclorina catiónica (Bchl-Cat) inactivó el microorganismo grampositivo *Staphylococcus aureus*. Para *Pseudomonas aeruginosa*, la inhibición alcanzó aproximadamente 3 log a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  de Bchl-Cat y una dosis de luz de 45  $\text{J}/\text{cm}^2$ . En *Escherichia coli* la inhibición fue de aproximadamente 4 log a una concentración de 250  $\mu\text{M}$  de Bchl-Cat y una dosis de luz de 45  $\text{J}/\text{cm}^2$ . En *Salmonella typhimurium* la inhibición de 5 logs a una concentración de 250  $\mu\text{M}$  de Bchl-Cat y dosis de luz de 20, 30 y 45  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Para la levadura *Candida albicans*, Bchl-Cat inhibió aproximadamente 3 logs a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  y una dosis de luz de 45  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Bchl-M fue capaz de inhibir alrededor de 3 logs a una concentración de 250  $\mu\text{M}$  y dosis de luz de 20, 30 y 45  $\text{J}/\text{cm}^2$  de la levadura *Candida albicans*. Estos resultados son significativos y pueden indicar la inactivación de bacterias Gramnegativas con un fotosensibilizador catiónico. Otros estudios pueden insertar más grupos catiónicos en la molécula para aumentar su capacidad de interactuar con la pared de estos microorganismos.

**Palabras clave:** Grampositivos; Gramnegativos; levadura; fotoinactivación; resistencia bacteriana; catiónico.

BILHA, Juliana K. Biotechnological Potential of Microorganisms in Obtaining Bacteriochlorins for the Photodynamic Inactivation. Defense date: March 14, 2025. Total number pages: 82. Thesis (Doctorate) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu.

## ABSTRACT

Microorganisms can be natural sources of several molecules with biotechnological potential to produce compounds for clinical and industrial applications, providing innovative and sustainable solutions in these areas. Bacteriochlorophyll extracted from groups of non-sulfur purple bacteria, when structurally modified, can produce the photosensitizer Bacteriochlorin, which is used in photodynamic therapy. Photodynamic therapy is a photochemical reaction that requires the presence of photosensitizing molecules that, when irradiated with light of a specific wavelength, lead to the generation of reactive oxygen species through the excitation of molecular oxygen and, consequently, result in cell death. It has been used to treat bacterial and/or fungal infections, showing advantages when compared to antibiotics, since there is no bacterial resistance in this type of therapy. In addition, photodynamic therapy has shown efficiency for both Gram-positive and Gram-negative bacteria. To this end, in this study, pigmented microorganisms isolated from sediments of sewage environments, lake bottom environments and Antarctic environments were tested to obtain natural photosensitizers. A cationic bacteriochlorin (Bchl-Cat) obtained from the extraction of bacteriochlorophyll from *Rhodospseudomonas faecalis* was also produced. Bchl-Cat and methoxy bacteriochlorin (Bchl-M) were used for photoinactivation studies. The results obtained demonstrate the biotechnological potential of a molecule extracted from bacteria in leachate samples. In addition, cationic bacteriochlorin (Bchl-Cat) inactivated the Gram-positive microorganism *Staphylococcus aureus*. For *Pseudomonas aeruginosa*, inhibition reached approximately 3 logs at a concentration of 100  $\mu\text{M}$  of Bchl-Cat and a light dose of 45  $\text{J}/\text{cm}^2$ . In *E. coli*, the inhibition was approximately 4 logs at a concentration of 250  $\mu\text{M}$  of Bchl-Cat and a light dose of 45  $\text{J}/\text{cm}^2$ . In *Salmonella typhimurium*, the inhibition was 5 logs at a concentration of 250  $\mu\text{M}$  of Bchl-Cat and light doses of 20, 30 and 45  $\text{J}/\text{cm}^2$ . For the yeast *Candida albicans*, Bchl-Cat inhibited approximately 3 logs at a concentration of 100  $\mu\text{M}$  and a light dose of 45  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Bchl-M was able to inhibit approximately 3 logs at a concentration of 250  $\mu\text{M}$  and light doses of 20, 30 and 45  $\text{J}/\text{cm}^2$  of the yeast *Candida albicans*. These results are significant and may indicate inactivation of Gram-negative bacteria with a cationic photosensitizer. Further studies may include more cationic groups in the molecule to increase its ability to interact with the cell wall of these microorganisms.

**Keywords:** Gram-positive; Gram-negative; yeast; photoinactivation; bacterial resistance; cationic.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Objetivos do Desenvolvimento Sustentável .....	22
Figura 2: Parede celular da Bactéria Gram-positiva .....	24
Figura 3: Parede celular da Bactéria Gram-negativa .....	25
Figura 4: Parede celular fúngica .....	27
Figura 5: Diagrama de Jablonski adaptado .....	28
Figura 6: Molécula de hematoporfirina purificada .....	30
Figura 7: Estrutura de fotossensibilizadores tetrapirrólicos cíclicos.....	30
Figura 8: Estrutura da Clorina e6 ou Photoditazine® .....	31
Figura 9: Bacterioclorinas catiônicas sintéticas. ....	33
Figura 10: Mapa mostrando os pontos de coleta das amostras .....	39
Figura 11: Espectro UV-VIS em diclorometano do extrato da amostra CH1 .....	46
Figura 12: Síntese de bacterioclorina catiônica, a partir da bacterioclorina metoxi .....	48
Figura 13: Espectro de <sup>1</sup> H-RMN da Bacterioclorina metoxi .....	48
Figura 14: Espectro de <sup>1</sup> H-RMN da bacterioclorina Bchl-Amina .....	50
Figura 15: Espectro UV-VIS da Bacterioclorina Amina .....	50
Figura 16: Espectro de <sup>1</sup> H-RMN da bacterioclorina catiônica.....	51
Figura 17: Espectro UV-VIS da Bacterioclorina Catiônica.....	52
Figura 18: Bacterioclorinas Bchl-M e Bchl-Cat.....	54
Figura 19: Espectro UV-VIS de bacterioclorinas .....	53
Figura 20: Fotodegradação de Bchl-Cat Bchl-M em diclorometano .....	54
Figura 21: Gráfico da fotoinativação de <i>P. aeruginosa</i> com 30 e 45 J/cm <sup>2</sup> .....	55
Figura 22: Fotoinativação de <i>S. aureus</i> com 20, 30 e 45 J/cm <sup>2</sup> .....	57
Figura 23: Fotoinativação de <i>E. coli</i> com 20, 30 e 45 J/cm <sup>2</sup> .....	60
Figura 24: Fotoinativação de <i>Salmonella typhimurium</i> com 20, 30 e 45 J/cm <sup>2</sup> .....	62
Figura 25: Fotoinativação de <i>Candida albicans</i> com 20, 30 e 45 J/cm <sup>2</sup> .....	64

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 01: Bacterioclorinas catiônicas e microrganismos submetidos à fotoinativação.....	34
Tabela 02: Meio de cultura para bactérias púrpuras não sulfurosas.....	37
Tabela 03: Resultado da reativação das linhagens bacterianas para obtenção de fontes alternativas de bacterioclorinas.....	45

**LISTA DE SIGLAS**

<b>AMR</b>	Antimicrobial Resistance
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>Bchl-Cat</b>	Bacterioclorina Catiônica
<b>Bchl-M</b>	Bacterioclorina Metóxi
<b>Bchl Amina</b>	Bacterioclorina Amina
<b>BHI</b>	Brain Heart Infusion
<b>CDCI<sub>3</sub></b>	Clorofórmio Deuterado
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Diclorometano
<b>CH<sub>3</sub>OH</b>	Metanol
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>ESBL</b>	Betalactamases de espectro estendido
<b>EMA</b>	Agência Europeia de Medicina
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FS</b>	Fotossensibilizador
<b>H-RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>NIR</b>	Near Infrared
<b>ODS</b>	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PA</b>	Grau analítico
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>ppm</b>	Parte por milhão
<b>RAM</b>	Resistência Antimicrobiana
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>TFD</b>	Terapia Fotodinâmica
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia

## Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	20
<b>2.1 DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MICRORGANISMOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MICRORGANISMOS DO AMBIENTE ANTÁRTICO .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS.....</b>	<b>22</b>
2.4.1 Bactérias Gram-positivas.....	24
2.4.2 Bactérias Gram-negativas: .....	25
<b>2.5 RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA .....</b>	<b>26</b>
<b>2.6 TERAPIA FOTODINÂMICA NA INATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS .....</b>	<b>27</b>
2.6.1 Fotossensibilizador .....	29
2.6.2 Bacterioclorina Catiônica .....	33
3 OBJETIVOS.....	36
<b>3.1 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>36</b>
4 METODOLOGIA .....	37
<b>4.1 CULTIVO DE BACTÉRIAS PÚRPURAS NÃO SULFUROSAS: .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2 CULTIVO DE BACTÉRIAS DAS AMOSTRAS ISOLADAS: .....</b>	<b>38</b>
<b>4.3 EXTRAÇÃO DA BACTERIOCLOROFILA DA BACTÉRIA <i>R. faecalis</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4 OBTENÇÃO DA BACTERIOCLORINA AMINA (Bchl-Amina):.....</b>	<b>39</b>
<b>4.5 OBTENÇÃO DA BACTERIOCLORINA CATIÔNICA (Bchl-Cat):.....</b>	<b>40</b>
<b>4.6 EXTRAÇÃO DA BACTERIOCLOROFILA DA BACTÉRIA VERMELHA: .....</b>	<b>40</b>
<b>4.7 CRESCIMENTO DAS CÉLULAS MICROBIANAS: .....</b>	<b>41</b>
<b>4.8 FOTOINATIVAÇÃO: .....</b>	<b>41</b>
<b>4.9 ANÁLISE GENÉTICA DAS AMOSTRAS ISOLADAS:.....</b>	<b>42</b>
<b>4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....</b>	<b>42</b>
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
<b>5.1 CRESCIMENTO DAS AMOSTRAS ISOLADAS.....</b>	<b>43</b>
<b>5.2 OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS MOLÉCULAS .....</b>	<b>45</b>
<b>5.3 OBTENÇÃO DAS BACTERIOCLORINAS MODIFICADAS.....</b>	<b>47</b>
<b>5.4 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA .....</b>	<b>54</b>
5.4.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	54
5.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	57

	17
<b>5.4.3 <i>Escherichia coli</i></b> .....	59
<b>5.4.4 <i>Salmonella thiphimurium</i></b> .....	61
<b>5.4.5 <i>Candida albicans</i></b> .....	63
<b>5.4.6 BACTÉRIA ISOLADA DA AMOSTRA DE CHORUME, <i>Serratia sp</i></b> .....	65
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	67
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	68

## 1 INTRODUÇÃO

Microrganismos podem ser uma fonte natural de moléculas com potencial biotecnológico, pois seus metabólitos secundários incluindo alcalóides, lipídios, macrocíclicos, terpenos, peptídeos, quinonas, policetonas e outros tipos estruturais, podem possuir atividade antibacteriana, antitumoral, antiviral, imunomoduladora, antioxidante entre outras atividades biológicas (WANG et al., 2016; FENG et al., 2019). O ambiente aquático possui uma grande variedade de microrganismos com características fisiológicas que permitem a sobrevivência em condições ambientais extremas, e a busca por microrganismos com importância biotecnológica nestes locais tem sido cada vez mais frequente (KENNEDY et al., 2011).

Moléculas fotossensibilizadoras desempenham uma das principais funções na terapia fotodinâmica e sua capacidade fotoquímica é essencial na eficiência da terapia. Algumas moléculas naturais podem ser utilizadas com esta finalidade e, além disso, é possível realizar alterações estruturais nas moléculas para torná-las mais eficientes e com potencial de aplicação clínica (ORMOND et al., 2013; PUCELIK et al., 2017; OLIVEIRA, et al., 2015; PUCELIK; SUŁEK; DAŁBROWSKI, 2020; SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002). Bacterioclorinas são moléculas produzidas a partir de bacterioclorofilas extraídas de grupos de bactérias púrpuras não sulfurosas que podem ser encontradas em ambientes aquáticos como, por exemplo, a produzida por *Rhodopseudomonas faecalis* (BARBOSA et al., 2018; LOPES, 2018; MARTINS et al., 2019) e *Rhodobacter capsulatus*, (MIRONOV, 1989). Essas moléculas são fotossensibilizadores eficientes pelo comprimento de onda que atuam com faixa de absorção de 740 a 760 nm (BALLATORE et al., 2020; NICHIPOROVICH et al., 2004; OLIVEIRA, et al., 2015) e diferem de outros derivados de macrociclo de tetrapirrol, porque têm uma banda de absorção de longo comprimento de onda que está localizado no infravermelho próximo à região NIR (Near Infrared) - Infravermelho Próximo (CHEN; LI; PANDEY, 2015). A atuação nessa banda de absorção possibilita a realização de estudos fotoquímicos com luz de menor energia e permite a captura de uma grande fração da luz solar (BALLATORE et al., 2020).

A terapia fotodinâmica é uma técnica baseada em uma reação fotoquímica que requer a presença de moléculas fotossensibilizadoras e de luz num comprimento de onda específico, que leva à geração de espécies reativas de oxigênio, através da excitação do oxigênio molecular e, conseqüentemente, resulta em morte celular (CUI et al., 2019). Esse tipo de terapia tem avançado no tratamento de alguns tipos de câncer (BAGNATO et al., 2017; AGOSTINIS et al., 2011), e tem mostrado eficácia na inativação de células bacterianas e/ou fúngicas (BALLATORE et al., 2020; MEEROVICH et al., 2019; MEEROVICH et al., 2020; MEEROVICH et al., 2018). Para as infecções

bacterianas o tratamento apresenta vantagem se comparado ao tratamento com antibióticos, pois tem mostrado eficiência tanto para bactérias Gram-positivas quanto bactérias Gram-negativas, bem como para as bactérias resistentes a antibióticos (HABLIM et al.; SOBOTTA et al., 2019).

O aumento e o uso inapropriado de antibióticos provocaram o surgimento da resistência antimicrobiana (MUNITA; ARIAS et al., 2016; PULINGAM et al., 2022), que atualmente é um grande problema de saúde pública, com taxas de mortalidade de 700.000 mortes por ano e com estimativas de 10 milhões de mortes em todo o mundo até o ano de 2050 (PULINGAM et al., 2022), além do aumento dos gastos de saúde pública em países em desenvolvimento principalmente devido a tratamentos de alto custo e internações hospitalares prolongadas (PULINGAM et al., 2022), bem como de comprometimento do progresso nos setores clínico e agrícola nos próximos anos (SINGER; KIRCHHELLE; ROBERTS, 2020; ZHU; HUANG; YANG, 2022; WHO et al., 2021; O'NEILL et al., 2016).

O desenvolvimento de pesquisas em saúde é fundamental para possibilitar o acesso da população mundial a vacinas e medicamentos para doenças transmissíveis e não transmissíveis, permitindo o desenvolvimento humano sustentável e o equilíbrio da vida no planeta (ONU, 2024). Como doenças causadas por bactérias, são atualmente um dos principais problemas de saúde, e que muitas bactérias são resistentes aos tratamentos utilizados atualmente, pesquisas que busquem novas fontes de moléculas que podem ser utilizadas como fotossensibilizadores e que possam inativar microrganismos patogênicos são consonantes com os ODS (Objetivos de Desenvolvimento Sustentável). Assim, o presente estudo realizou a semi-síntese de dois fotossensibilizadores derivados de bacterioclorofila e avaliação da inativação de diferentes microrganismos utilizando diferentes concentrações e diferentes doses de luz.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

A sustentabilidade é um assunto que precisa ser colocado em pauta nos meios acadêmicos, científicos e da comunidade em geral, visto que a necessidade de diminuir os impactos e desigualdades causados pela comunidade humana sobre si mesma e sobre o planeta, é cada vez mais urgente. Para tanto, a ONU desenvolveu 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) (Figura 1) que abordam os principais desafios de desenvolvimento enfrentados por pessoas no Brasil e no mundo (IPEA, 2024).

Dentre esses 17 objetivos, o objetivo 3, chama a atenção para assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para toda população em todas as idades. A saúde é aspecto essencial para o desenvolvimento humano sustentável e manutenção do equilíbrio no planeta, e a importância deste tema remota a todas as civilizações humanas. Para tanto, o ponto 3b deste objetivo, visa apoiar a pesquisa e o desenvolvimento de vacinas e medicamentos para as doenças transmissíveis e não transmissíveis, que afetam principalmente os países em, e proporcionar o acesso a medicamentos e vacinas essenciais a preços acessíveis (ONU, 2024).



Figura1: Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS). Fonte: (ONU). 2024

Além disso, o objetivo 12 que visa “Assegurar padrões de produção e de consumo responsáveis”, enfatiza no tópico 12a que é de suma importância o apoio aos países em desenvolvimento no fortalecimento de inovações científicas e tecnológicas sustentáveis para mudanças nos padrões de produção e consumo (IPEA, 2024).

Visto que a terapia fotodinâmica utiliza-se de moléculas que podem ser produzidas de forma sintética, mas também de moléculas que podem ser extraídas de microrganismos de ambientes naturais de forma sustentável de acordo com o objetivo do ODS 12, e que, além disso, tem mostrado resultados promissores em tratamentos de importantes doenças que atingem grande parte da população mundial, em consonância com o ODS 3, a terapia fotodinâmica é uma técnica terapêutica promissora e dentro dos padrões da sustentabilidade para um futuro saudável da comunidade humana e do planeta Terra.

## **2.2 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MICRORGANISMOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS**

Os ambientes aquáticos possuem uma ampla gama de microrganismos que são encontrados na forma planctônica, bentônica nos tapetes microbianos e em biofilmes. O plâncton, microrganismos planctônicos fotossintéticos como algas e cianobactérias, bacterioplâncton, formado por bactérias heterotróficas em suspensão na coluna de água, e zooplâncton, constituído pela população muito abundante neste ecossistema. A zona bentônica suporta uma comunidade de microrganismos aquáticos de grande diversidade fisiológica como por exemplo as bactérias fermentadoras (SHARMA, 2005). Nos tapetes microbianos são encontradas cianobactérias na parte superior e logo abaixo observa-se uma camada de microrganismos fototróficos aeróbios e anaeróbios. As bactérias púrpuras sulfurosas são bactérias fotossintetizantes e podem formar uma camada distinta logo abaixo da interface aeróbica-anaeróbica. Os biofilmes podem desenvolver-se em qualquer superfície submersa ou úmida, e resultam da adesão e subsequente proliferação de bactérias na superfície de objetos (SHARMA, 2005; MANDIGAN, 2004).

Como os ambientes aquáticos possuem grupos de microrganismos taxonomicamente diversos e que exibem características fisiológicas e estruturais únicas que permitem a sobrevivência em condições ambientais extremas, a exploração desses ambientes para obtenção de produtos naturais tem se tornado cada vez mais interessante (KENNEDY et al., 2011).

## **2.3 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MICRORGANISMOS DO AMBIENTE ANTÁRTICO**

A Antártica é um ambiente com temperaturas extremamente baixas e flutuantes (-10 °C a -60 °C), condições climáticas únicas no planeta, por estar localizada no ponto mais meridional da Terra. Apresenta níveis de salinidade de 3,5%, pressões que excedem 100 MPa, baixa disponibilidade de água e nutrientes e alta radiação solar (CHOWN et al., 2015).

O ecossistema Antártico constitui-se de poucas espécies de animais e plantas que conseguem sobreviver neste ambiente, mas, por outro lado, estudos têm demonstrado a presença de uma grande diversidade microbiana resistente às condições extremas encontradas neste habitat, devido às adaptações fisiológicas que permitiram a disseminação de microrganismos psicrófilos (CHOWN et al., 2015; TOMOVA et al., 2015).

As adaptações às condições extremas dos microrganismos isolados do ambiente Antártico, fazem com que as células microbianas recuperadas deste ambiente, sejam capazes de sintetizar compostos ativos naturais utilizáveis no controle de doenças microbianas (O'BRIEN et al., 2004). Além disso, estudos tem demonstrado uma intensa gama de compostos naturais com potencial biotecnológico produzidos por bactérias e fungos encontrados na Antártica. Dentre os compostos produzidos por destes microrganismos, vale destacar os pigmentos, que apresentaram atividade antioxidante e/ou importante estabilidade quando expostos à luz ultravioleta (SILVA, 2018), diversas enzimas adaptadas ao frio (RAY et al., 1992, LARIO et al., 2015), metabólitos secundários incluindo alcalóides, lipídios, macrocíclicos, terpenos, peptídeos, quinonas, policetonas e outros tipos estruturais, que tem demonstrando atividade antibacteriana, antitumoral, antiviral, imunomodulador, antioxidante entre outras atividades biológicas (WANG et al., 2016; FENG et al., 2019).

## **2.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS**

Atualmente, um dos grandes problemas de saúde pública mundial é o surgimento da resistência antimicrobiana (RAM ou AMR em inglês). As taxas de mortalidade alcançam mais de 700.000 mortes por ano e o uso exagerado de antibióticos, bem como o uso incorreto de antibióticos são os principais responsáveis pelo surgimento da RAM (PULINGAM, 2020; OMS, 2021). As bactérias Gram-negativas, e os patógenos multirresistentes tem sido os principais responsáveis por infecções bacterianas difíceis de tratar, e que tem causado esse número alarmante de mortes no mundo (BAG et al., 2019; HAMBLIN, et al., 2016; ZIGANSHYNA et al., 2020). Se o uso excessivo e inapropriado de antibióticos permanecer nos níveis atuais, as estimativas preveem que até o ano de 2050, as infecções bacterianas poderão atingir 50 milhões de pessoas e possivelmente causar 10

milhões de mortes em todo o mundo (PULINGAM, et al., 2020), (ZHU; HUANG; YANG, 2022; WHO, et al., 2014; O'NEILL, et al., 2014). Há relatos de incidência de resistência a antibióticos principalmente relacionada a *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (BERGER-BÄCHI; ROHRER, 2002).

Os problemas causados pela resistência antibacteriana, vão além das taxas de morbidade e mortalidade, visto que RAM também é responsável pelo aumento dos gastos de saúde pública em países em desenvolvimento principalmente devido a tratamentos de alto custo e internações hospitalares prolongadas (PULINGAM, et al.2022). A descoberta dos antibióticos foi um grande marco da medicina e permitiu que muitas vidas fossem preservadas nos últimos 80 anos, mas o aumento dos níveis de resistência bacteriana aos antibióticos poderá ser a causa de mortes, mesmo para infecções bacterianas previamente tratáveis bem como de comprometimento do progresso nos setores clínico e agrícola nos próximos anos (SINGER; KIRCHHELLE; ROBERTS, 2020).

A resistência a antibióticos ocorre quando os microrganismos neutralizam a ação dos agentes antimicrobianos, ou seja, o antibiótico perde sua eficiência na inibição do crescimento bacteriano. Dessa forma, os agentes antimicrobianos tornam-se gradualmente menos eficazes e as infecções mais persistentes nos indivíduos, o que ajuda propagar a contaminação e aumentar ainda mais o risco de resistência (ZHU; HUANG; YANG, 2022; SCHASTAK et al., 2008). Em geral, dois pontos se destacam na RAM, o primeiro é que o desenvolvimento de novos antibióticos é insuficiente para acompanhar o aumento de patógenos resistentes e o segundo é que o uso desnecessário de antibióticos promove ainda mais a seleção dos patógenos resistentes (PULINGAM, et al. 2022). Além disso, a RAM comprometerá a eficácia nas terapias contra outras doenças, como quimioterapia para câncer, tratamento de HIV e malária (ZHU; HUANG; YANG, 2022).

A RAM aumentou consideravelmente durante a pandemia de coronavírus em 2019 (COVID-19), pois os antibióticos passaram a ser cada vez mais prescritos para tratar infecções secundárias (PULINGAM, et al. 2022). A Organização Mundial de Saúde (OMS) pressupõe que a pandemia possa ter invalidado muitos dos esforços que têm sido realizados por muitos anos na diminuição da resistência aos antibióticos (PULINGAM, et al. 2022). O aumento das internações hospitalares, e a dificuldade em implementar medidas de controle de infecção durante a pandemia de COVID-19 causou uma sobrecarga no sistema de saúde e, conseqüentemente dificultou a identificação e rastreamento de possíveis infecções bacterianas hospitalares resistentes a antibióticos (SMITH et al., 2017).

### 2.4.1 Bactérias Gram-positivas:

As bactérias denominadas Gram-positivas são aquelas que possuem na sua parede celular uma camada espessa de peptidoglicano composto por cadeias longas de açúcares (N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico) interligadas por pontes peptídicas envolvendo a membrana plasmática, ácidos teicoicos e lipoteicoicos que são polímeros de glicerol e proteínas de superfície que são importantes na interação celular (MUNITA; ARIAS, 2015) (Figura 2).

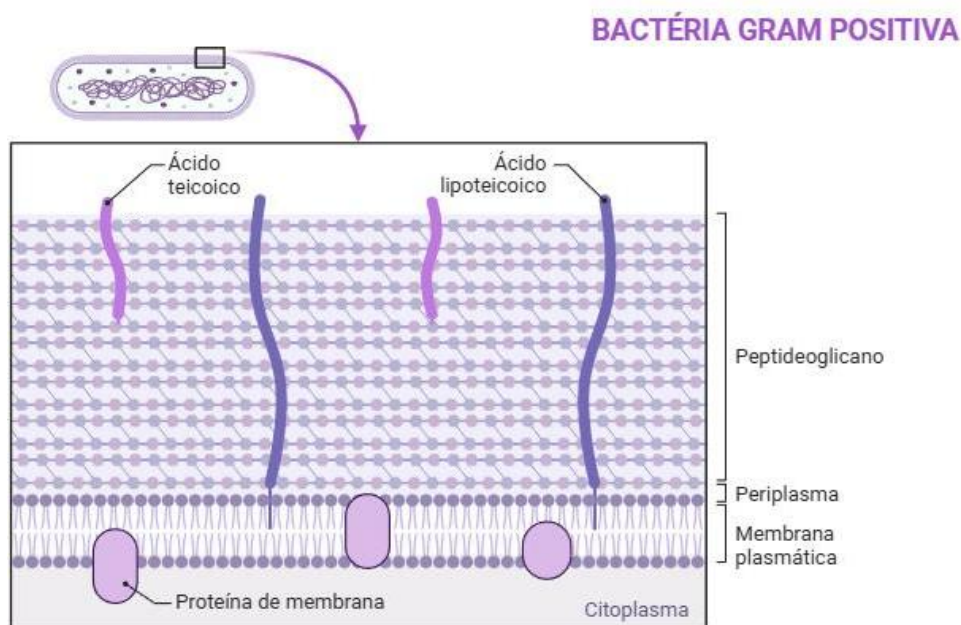


Figura 2: Parede celular da Bactéria Gram-positiva, composta por membrana plasmática, periplasma e uma camada espessa de peptidoglicano composto por ácido teicoico e ácido lipoteicoico. Fonte: AUTORA, 2024.

A resistência a antibióticos por esse grupo de bactérias pode ocorrer quando os mecanismos de ação dos fármacos são inviabilizados pela atividade das enzimas  $\beta$ -lactamases, ou quando eventos moleculares inibem a atividade dos antibióticos, podendo ocorrer por alterações exógenas no DNA, levando a mudanças nos sítios de ligação enzimática (BERGER-BÄCHI; ROHRER, 2002; MUNITA; ARIAS, 2015; ZIGANSHYNA et al., 2020). *Staphylococcus aureus* é uma espécie de bactéria Gram-positiva, capazes de sobreviver em amostras clínicas secas, ao calor e em concentrações adversas de salinidade. Por sua resistência a muitos antibióticos é um importante patógeno de diversas partes do corpo humano (MUNITA; ARIAS, 2015). Alguns estudos mostraram resultados interessantes na inativação fotodinâmica de bactérias como *S. aureus*, utilizando bacterioclorinas como fotossensibilizador (AKHLYUSTINA, et al., 2018 AKHLYUSTINA; et al., 2019; TIGANOVA; ZHIZHIMOVA; PHILIPOVA, 2020; HUANG, et al., 2010; HUANG, et al., 2014). BARBOZA et al., (2018) obtiveram bons resultados na inativação de *S. aureus* com

bacterioclorina sintetizada de bacterioclorofila extraída de bactérias púrpuras não sulfurosas e BALLATORE et al., (2020) com bacterioclorina bis (espermine).

## 2.4.2 Bactérias Gram-negativas:

As bactérias denominadas Gram-negativas possuem complexidade diferenciada em sua parede celular pela presença de duas diferentes camadas, uma de peptidoglicano extremamente fina e uma denominada membrana externa, constituída de dupla camada de fosfolipídios, com a camada interna semelhante às membranas celulares e com a camada externa composta de lipopolissacarídeo que atua como antígeno (Figura 3). A porção lipídica atua como endotoxina estimulando respostas imunes, tornando a membrana externa assimétrica, resistente a corrosão e capaz de repelir compostos hidrofóbicos (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010; MADIGAN; MARTINKO; PARKER et al., 2004).

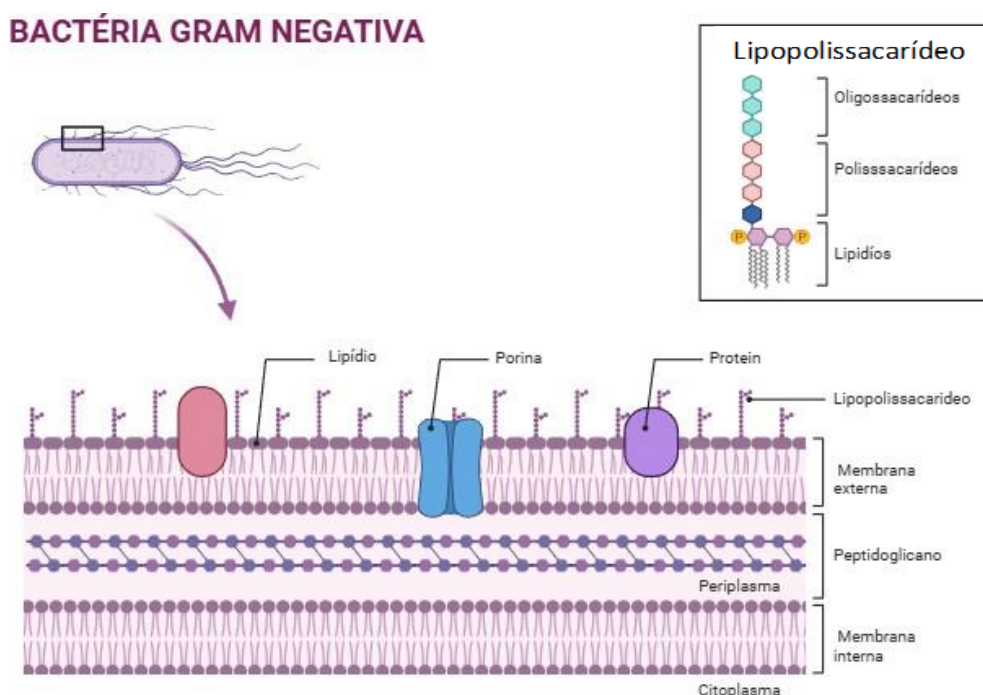


Figura 3: Parede celular da Bactéria Gram-negativa, que possui uma membrana interna, periplasma, camada de peptidoglicano e uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos. Fonte: AUTORA, 2024.

Os mecanismos de resistência das bactérias Gram-negativas estão relacionados a produção de enzimas, como as  $\beta$ -lactamases, as quais podem ser mais ativas nesse grupo de organismos. São codificadas por cromossomos ou plasmídeos e atuam na hidrólise do anel betalactâmico de drogas antimicrobianas. As  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL-*Extended-Spectrum BetaLactamase*) levam à resistência para penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos,

carbapenêmicos, e, inclusive de inibidores de betalactamases, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, sendo encontradas em linhagens de *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Pseudomonas* spp., e *K. pneumoniae*. A resistência também pode ocorrer por outras  $\beta$ -lactamases que conferem resistência aos betalactâmicos, inclusive os carbapenêmicos. Linhagens pertencentes a família Enterobacteriaceae, bem como linhagens de *Acinetobacter* e *P. aeruginosa*, capazes de produzir betalactamases de espectro estendido (ESBL) e, linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases (KPC), são as principais causas de doenças infecciosas e de mortalidade por bactérias (BERGER-BÄCHI; ROHRER, 2002; MUNITA; ARIAS, 2015; SMITH, et al., 2017).

Alguns estudos mostraram resultados interessantes na inativação fotodinâmica de bactérias Gram-negativas como *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, utilizando bacterioclorinas catiônicas como fotossensibilizador (AKHLYUSTINA et al., 2018; AKHLYUSTINA et al., 2019; HUANG et al. 2010; HUANG et al., 2014).

## 2.5 RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA

As doenças fúngicas também representam um desafio atual de saúde pública, e, dentre elas, as infecções fúngicas cutâneas e orais estão entre as predominantes. O aumento da resistência a medicamentos antifúngicos por diversas espécies de fungos e o crescimento de infecções por espécies de *Candida*, bem como o aumento de doenças como diabetes e doenças imunológicas, tornam mais complexo o tratamento da candidíase (BONGOMIN et al, 2017). Dados indicam que até 29,5% das espécies de *Candida* apresentam resistência ao fluconazol, enquanto até 3% resistem a medicamentos de segunda linha, como o voriconazol. A resistência é mais notória entre as espécies de *Candida*, o que amplia as preocupações já existentes sobre o controle eficaz dessas infecções. Portanto, a necessidade de novas abordagens terapêuticas e do desenvolvimento de agentes capazes de superar a resistência apresentada por *Candida* spp., torna-se um desafio no âmbito do tratamento médico (PFALLER et al, 2010; SEYED-JAVADI LIMOODI et al, 2021). A parede celular da célula fúngica (Figura 4) possui camadas de proteínas e açúcares que podem atuar na interação com os medicamentos.

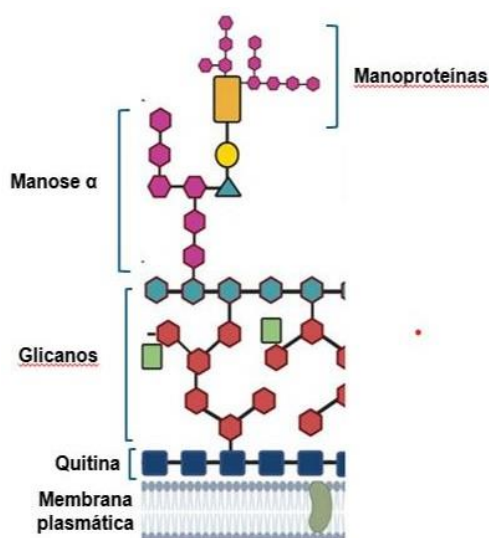


Figura 4: Composição química da parede celular fúngica. Fonte: Adaptado de FEIJÓO-VIVAS, 2021.

## 2.6 TERAPIA FOTODINÂMICA NA INATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS

A terapia fotodinâmica (TFD) começou a ser estudada em 1900 na Alemanha onde foi publicado o primeiro estudo sobre os efeitos fotodinâmicos de compostos químicos contra microrganismos, observando a toxicidade do hidrocloreto de acridina contra *Paramecium caudatum* (MOAN; PENG, 2003). A aplicação da técnica foi testada em microrganismos e vírus antes da Segunda Guerra, mas foi deixada de lado com a chegada das sulfonamidas e da penicilina. Na última década, a aplicação da terapia fotodinâmica em microrganismos ressurgiu devido à disseminação do HIV e ao aumento das infecções hospitalares causadas por bactérias resistentes (PERUSSI, 2007). Os principais alvos em células de mamíferos são lisossomos, mitocôndrias e membranas plasmáticas, enquanto em células microbianas o dano à membrana externa é crucial para causar dano ao DNA. A terapia fotodinâmica tópica pode ser usada em infecções em tecidos não perfundidos, como queimaduras, e apresenta menor toxicidade comparada a outros tratamentos antimicrobianos tópicos (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

A inativação fotodinâmica de microrganismos envolve a utilização de fotossensibilizadores, luz e oxigênio molecular ( $O_2$ ) para promover a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). O processo é descrito pelo diagrama de Jablonski (Figura 5) e inicia-se com a adição do fotossensibilizador (FS) no estado singlete ( $S_0$ ) e subsequente incubação, seguida de uma concentração específica de onda e de um estado elétrico mais excitado ( $S_1$ ). O FS excitado libera fosforescência, mas alguns pigmentos transferem energia para o oxigênio molecular ( $O_2$ ). A molécula reativa no estado tripleto ( $^3O_2$ ) se transforma em oxigênio no estado singlete ( $S_0$ ). Espécies reativas

de oxigênio singleto causam danos celulares e subsequente morte celular (apoptose/necrose). Na terapia fotodinâmica, a formação de oxigênio singleto é mais eficaz, mas ambos os mecanismos conduzem ao desenvolvimento de espécies reativas de oxigênio (ROS). É importante notar que a luz, o FS e o  $O_2$  não são tóxicos individualmente, mas juntos produzem espécies reativas de oxigênio ou espécies oxidativas radicais que causam a morte celular (OLIVEIRA et al., 2015; MANOEL; PAOLILLO; DE MENEZES, 2014; BAGNATO; REQUENA, 2023).

Estratégias recentes envolvendo novos radicais como o hidrogênio e o carbono, bem como fotossensibilizadores baseados no microambiente tumoral em hipoxia, podem ser utilizados para controlar os microrganismos. Espectros eletromagnéticos não visíveis, ultrassom e campos eletromagnéticos também podem ser usados para aumentar a eficácia da terapia fotodinâmica na inativação de microrganismos, ajudando a superar as limitações atuais e a melhorar a eficácia da terapia fotodinâmica em infecções microbiológicas (RODRIGUES; CORREIA, 2022).

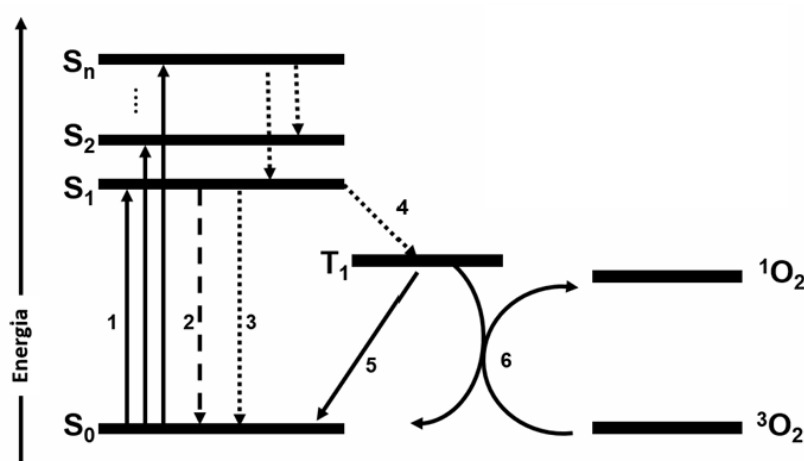


Figura 5: Diagrama de Jablonski adaptado. Onde S<sub>0</sub> é o estado fundamental do fotossensibilizador, S<sub>1</sub> é o fotossensibilizador excitado por energia luminosa, quando ocorre a absorção de luz (1), S<sub>2</sub> e S<sub>n</sub> estados do fotossensibilizador com maior excitação, T<sub>1</sub> é o estado de transferência por cruzamento inter-sistema onde ocorre a transferência de energia para uma molécula de oxigênio celular (6) e onde ocorre o retorno do fotossensibilizador para o estado S<sub>0</sub> (5) por fosforescência, (2) é fluorescência onde o S<sub>1</sub> pode voltar para S<sub>0</sub> e (3) é conversão interna onde o S<sub>1</sub> pode voltar para S<sub>0</sub>. Fonte: adaptado de BAGNATO; REQUENA, 2023.

A interação da luz com as células é crucial para a terapia fotodinâmica, pois fenômenos como reflexão, refração, transmissão, espalhamento e absorção dependem das propriedades ópticas dos componentes celulares. O espalhamento ilumina as células, embora cause perda de intensidade. No entanto, a absorção é onde ocorre a maior perda de intensidade, limitando a profundidade de penetração da luz nos tecidos eucariotos (BAGNATO; REQUENA, 2023; RODRIGUES; CORREIA, 2022). A absorção depende dos cromóforos presentes na célula bacteriana, como água, proteínas e lipídios presentes na membrana celular e no citoplasma das bactérias, resultando em efeitos biológicos que variam conforme o comprimento de onda da luz e a composição celular. A água presente nas células bacterianas tem uma alta absorção de luz

infravermelha, especialmente em comprimentos de onda acima de 900 nm e algumas bactérias possuem pigmentos que podem absorver luz em diferentes comprimentos de onda, incluindo o infravermelho. Por exemplo, bactérias fotossintéticas podem ter pigmentos que absorvem luz infravermelha para realizar a fotossíntese (ELAHI; BAKER, 2024).

A nível molecular, a luz é detectada pelas proteínas fotorreceptoras sensoriais que captam diferentes bandas do espectro eletromagnético, desde os comprimentos de onda do ultravioleta próximo (UV próximo) até ao infravermelho (NIR). A luz é convertida em respostas bioquímicas que podem ocorrer por alterações nos cromóforos ou outros componentes celulares e que podem levar a alterações enzimáticas. Alguns fotorreceptores são específicos de procariontes, enquanto outros são de origem eucariota. Por exemplo, os componentes de detecção de luz predominantes em *Escherichia coli* incluem os fitocromos e as proteínas LOV (light-oxygen-voltage) (KASSEM, et al., 2023).

Estudos tem relatado a sua eficácia em testes com linhagens bacterianas e/ou fúngicas (AROSO et al., 2019; BALATTORE et al., 2019; MEEROVICH et al., 2018; MEEROVICH et al., 2019; MEEROVICH et al., 2020; PRATAVIEIRA et al., 2021). Para as infecções bacterianas, o tratamento apresenta vantagem se comparado ao baseado em antibióticos, pois os estudos apontam inexistência de resistência bacteriana (HAMBLIN, 2016; MEEROVICH et al., 2018) e, além disso, a terapia fotodinâmica tem mostrado eficiência tanto para bactérias Gram-positivas quanto bactérias Gram-negativas (HAMBLIN; JORI, 2011; MEEROVICH et al., 2018; MEEROVICH et al., 2020), bem como para as bactérias resistentes a antibióticos (AKHLYUSTINA et al., 2019; SOBOTTA et al., 2019; ZIGANSHYNA et al., 2020; SHARMA et al., 2012).

### **2.6.1 Fotossensibilizador**

O fotossensibilizador desempenha uma das principais funções na terapia fotodinâmica e sua capacidade fotoquímica é essencial na eficiência da terapia. Algumas moléculas naturais podem ser utilizadas com esta finalidade e, além disso, é possível realizar alterações estruturais nas moléculas para torná-las mais eficientes e com potencial de aplicação clínica (STRATEN et al., 2017). Um fotossensibilizador precisa ter fotossensibilidade relativamente curta, liberação adequada para o organismo, alta afinidade e seletividade para o tecido doente, baixa agregação em soluções aquosas, baixa toxicidade na ausência de luz, não produzir efeitos adversos e, além disso, possuir comprimento de onda na faixa do infravermelho (600 e 800 nm), para não causar prejuízos no organismo/tecido alvo (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002; OLIVEIRA, et al., 2015).

Os fotossensibilizadores de primeira geração são derivados da hematoporfirina, surgiram no século XIX e foram utilizados para o diagnóstico de cânceres (STRATEN, et al., 2017). O primeiro fotossensibilizador, Photofrin® (Figura 6), derivado da hematoporfirina, foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos e pela Agência Europeia de Medicina (EMA) e ainda é o mais utilizado atualmente (CHEN; DAI, 2021; ATIF et al., 2012).

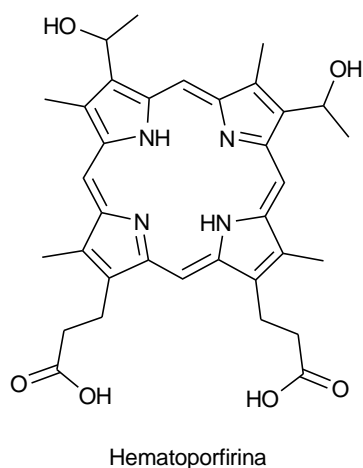


Figura 6: Molécula de hematoporfirina purificada (Photofrin®). Fonte: AUTORA.

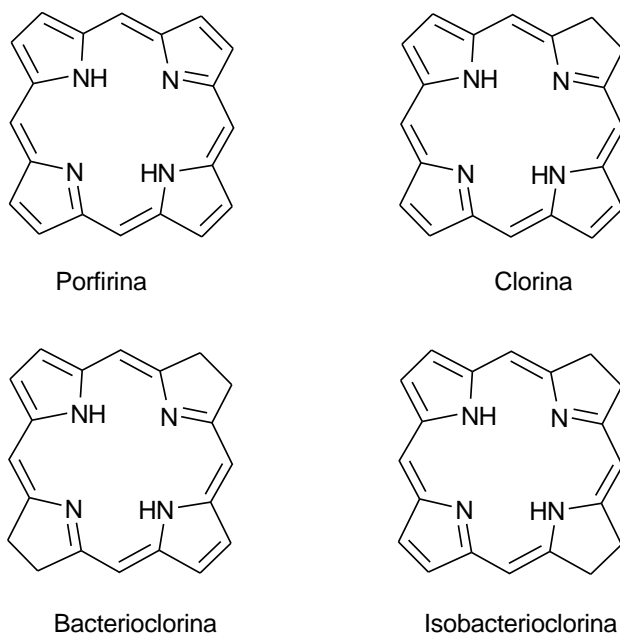


Figura 7: Estrutura de fotossensibilizadores tetrapirrólicos cíclicos: Bacterioclorigina, porfirina, clorigina e isobacterioclorigina. Fonte: AUTORA, 2024.

A segunda geração de fotossensibilizadores foram projetados para absorverem comprimento de onda maior, próximo do vermelho e diminuir o tempo de ação fotossensibilizadora.

São divididas em classes de porfirinas, clorinas, bacterioclorinas, isobacterioclorinas (Figura 7), texafirinas, ftalocianinas, porfínicos e fenotiazinas (ORMOND et al., 2013). A maior parte fotossensibilizadores são tetrapirrols cíclicos e são derivados de porfirinas, clorinas e bacterioclorinas que podem ser modificados por inserção de moléculas (GARLAND et al., 2009). Os principais fotossensibilizadores incluídos nessa geração são, o Visudyne®, Foscan®, Photoditazine® e o Levulan® (ULIANA et al., 2017).

Dentre os fotossensibilizadores utilizados para inativação de microrganismos estão compostos de diferentes grupos como os xantenos halogenados tais como Rosa de Bengala, fenotiazínicos tais como azul de toluidina e azul de metileno, acridinas e conjugados de clorina e6 (Figura 8) (PERUSSI, 2007). A clorina e6 ou Photoditazine®, derivada de clorofila extraída de bactérias fototróficas como *Rhodospirillum rubrum* (NICHIPOROVICH et al., 2004) e de cianobactéria (*Spirulina máxima*) e a bacterioclorina Tookad® comercial, derivada de bacterioclorofilas extraída de bactérias purpuras não sulfurosas (GARBO et al., 2004; GARLAND et al., 2009) são fotossensibilizadores obtidos de fontes naturais que vem sendo utilizados em terapia fotodinâmica com bons resultados.

Os fotossensibilizadores naturais são uma alternativa importante para inativação de microrganismos devido ao baixo custo e sustentabilidade. VILAÇA, et al., 2023 traz um compilado de compostos naturais utilizados na fotoinativação de microrganismos. Dentre eles destaca-se a curcumina testada em diversos estudos, inclusive com *S. aureus*, *E. coli*, e *Samonella spp* e a clorina e6 com resultados promissores em *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

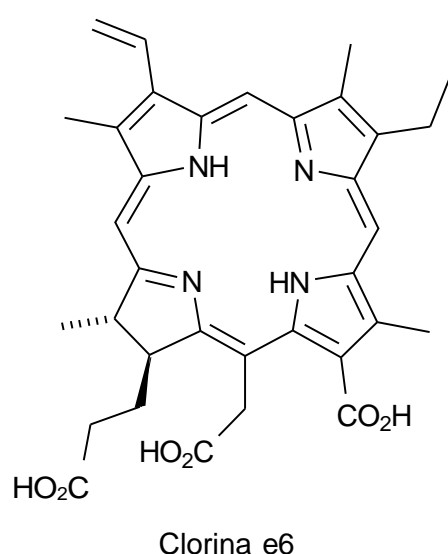


Figura 8: Estrutura da Clorina e6 contida no Photoditazine® é derivada de clorofila extraída de bactérias fototróficas como *Rhodospirillum rubrum*. Fonte: AUTORA, 2024.

O uso de fotossensibilizadores com porções catiônicas, conjugados a polímeros catiônicos ou administrados com peptídeos permeabilizantes, utilizados para inativação de microrganismos, tem se mostrados mais eficientes em bactérias, agindo em concentrações menores que as moléculas neutras e aniônicas. Diferenças na susceptibilidade ao fotossensibilizador também podem ser observadas entre as bactérias Gram-positivas e as Gram-negativas de forma que as Gram-negativas são mais resistentes aos fotossensibilizadores. A parede celular das bactérias Gram-negativas tem uma membrana externa mais complexa que inclui duas bicamadas lipídicas que funcionam como uma barreira física e funcional entre a célula e seu ambiente, enquanto as Gram-positivas possuem uma membrana que é relativamente permeável, visto que elas absorvem facilmente o corante na técnica de coloração de Gram (PERUSSI, 2007).

Cargas catiônicas podem ser consideradas como um dos mais importantes atributos para fotossensibilizadores antimicrobianos, pois a carga positiva no macrociclo tetrapirrólico promove uma forte interação eletrostática com locais carregados negativamente na superfície bacteriana. Este tipo de inserção aos fotossensibilizadores torna-os mais eficientes na inativação de bactérias Gram-negativas que possuem cargas negativas ao longo de sua parede celular (HABLIN, et al., 2016; KIM; LINDSEY, 2005). Porfirinas catiônicas podem ser obtidas pela inserção de substituintes carregados positivamente nas posições periféricas do macrociclo tetrapirrol (DLUGASZEWSKA, et al., 2017).

A presença de átomos de nitrogênio quaternizados ou grupos amino com propriedades básicas suficientemente fortes para permitir sua protonação em pH neutro é a característica mais comum dos substituintes periféricos que conferem às porfirinas um caráter catiônico (SCHASTAK, et al., 2010). A natureza e o número desses substituintes podem alterar as propriedades ópticas e foto físicas do composto original, mas o grau de hidrofobicidade pode ser ainda mais significativo. Este último, que também pode ser influenciado pelo número de frações catiônicas ou pela introdução de cadeias de hidrocarbonetos de comprimento diferente nos átomos de nitrogênio amino, é outro componente significativo que afeta a atividade antimicrobiana dos fotossensibilizadores (RUZIE, et al., 2009). As características hidrofóbicas ou hidrofílicas das porfirinas são conhecidas por influenciar a cinética e a extensão de suas ligações com células microbianas (DLUGASZEWSKA, et al. 2017).

A estrutura do fotossensibilizador e o número de grupos quaternizados catiônicos pode resultar em ligações diferentes e localização celular de ação diferente para Gram-positivas e Gram-negativas. Assim, é a estrutura da molécula que influencia na sua ação, visto que HUANG, et al., (2016) observou que propriedades fotoquímicas não eram alteradas pela estrutura da molécula, pois os rendimentos do estado tripleto excitado foram semelhantes em quatro compostos diferentes.

## 2.6.2 Bacterioclorina Catiônica

As bacterioclorinas fazem parte de uma segunda geração de fotossensibilizadores, as quais têm demonstrado bons resultados, podendo ser obtidas a partir de organismos vivos como células vegetais e microbianas e podem ser obtidas de forma sintética (STRATEN et al., 2017; ORMOND et al., 2013). As bacterioclorinas são fotossensibilizadores eficientes pelo comprimento de onda que atuam, com faixa de absorção de 740 a 780 nm (BALLATORE et al., 2019; NICHIPOROVICH et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2015) e diferem de outros derivados de macrociclo de tetrapirrol pois, apresentam uma banda de absorção de longo comprimento de onda intensa, que está localizada no infravermelho próximo à região NIR (região próxima do infravermelho) (YANG; HU; WANG, 2016). A atuação nessa banda de absorção possibilita a realização de estudos fotoquímicos com luz de menor energia bem como permite a captura de uma grande fração da luz solar (BALATTORE et al., 2019; LASSALLE et al. 2005).

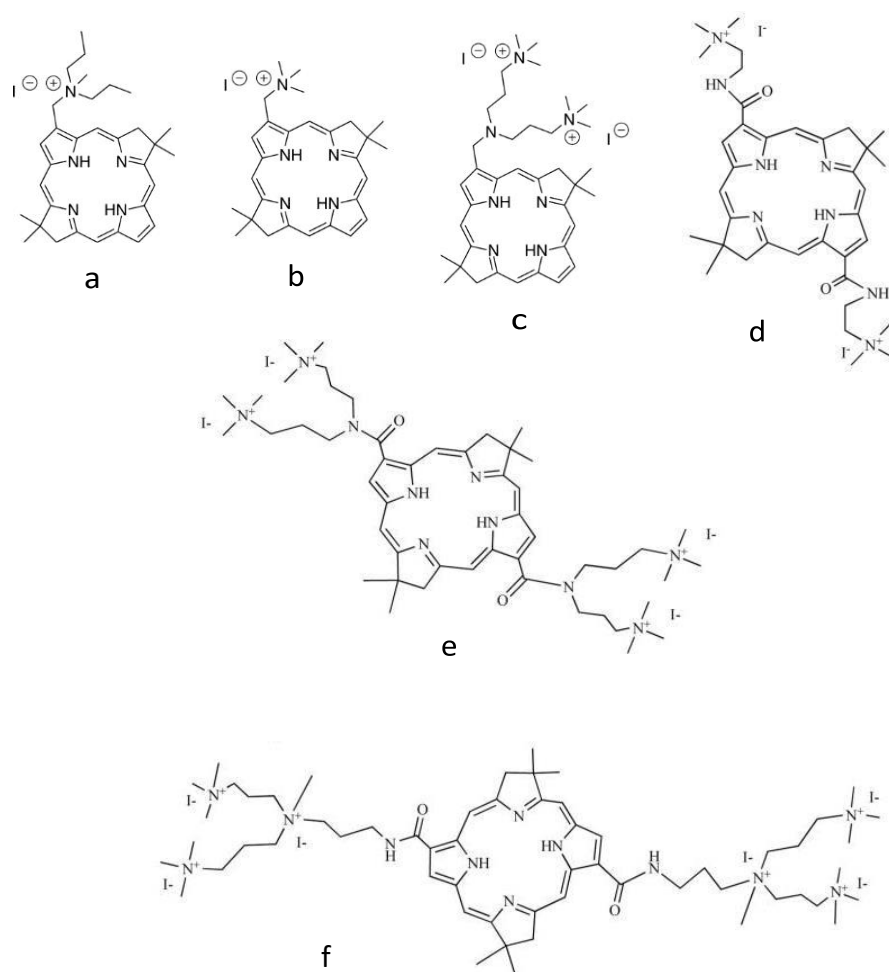


Figura 9: Bacterioclorinas catiônicas sintéticas. a e b monocatiônicas, c e d dicatiônicas, e tetracatiônicas e f hexacatiônicas. Fonte: adaptado de SHARMA, 2011; SHARMA, 2013.

SHARMA, et al., (2011) (Figura 9d, 9e e 9f), descreve três tipos de bacterioclorinas

catiônicas sintéticas a partir da porfirina, com dois, quatro e seis substituintes catiônicos. SHARMA et al., (2013), e HUANG et al. 2014 (Figura 9a, 9b e 9c), utilizaram três tipos de bacterioclorinas catiônicas sintéticas a partir da porfirina, uma com um único grupo amônio quaternizado e, portanto, monocatiônico e a outra com dois grupos amônio quaternizados e uma trialkilamina, portanto, dicatiônico. Todas as três bacterioclorinas possuem substituintes na posição 3. (HUANG, et al., 2014).

A tabela 01 reúne algumas bacterioclorinas catiônicas que apresentaram resultados interessantes na inativação de microrganismos.

Tabela 01: Bacterioclorinas catiônicas e microrganismos submetidos à fotoinativação.

<b>Autor, Ano</b>	<b>Tipo de Bacterioclorina</b>	<b>Microrganismo patogênico</b>
AKHLYUSTINA, E. V. et al., 2018	<b>Bch – 4G</b> <b>Bch – 4A</b>	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>
AKHLYUSTINA, E. V. et al., 2019	<b>Bch1</b> <b>Bch2</b> <b>Bch3</b>	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>
BALLATORE, M. B. et al., 2020	<b>BC-bis (spermine)</b>	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i>
BARBOZA, D. et al., 2018	<b>BC-TRISMA</b>	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>
GERALDE, M. C. et al., 2014	<b>BC</b>	<i>S. pneumoniae</i> , <i>K. Pneumoniae</i>
HUANG, L. et al., 2010	<b>BC catiônica (1, 2,3, 4)</b>	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. Albicans</i>
HUANG, L. et al., 2014	<b>BC catiônica (37, 38, 39)</b>	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>C. albicans</i> , <i>C. Neoformans</i>
MEEROVICH, G. A. et al., 2019	<b>BC tetracatiônica (patente Dudkin)</b>	<i>P. aeruginosa</i>
MEEROVICH, G. A. et al., 2020	<b>BC policatiônica (patente Dudkin)</b>	<i>P. aeruginosa</i>
MEEROVICH, G. A. et al., 2018	<b>Bch – 4G</b> <b>Bch – 4A</b>	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>
MEEROVICH, G. A. et al., 2016	<b>Bcl4</b> <b>Bcl8</b>	<i>P. aeruginosa</i>
MESQUITA, M. Q. et al., 2014	<b>Iso BC catiônica</b>	<i>E. coli</i>
TIGANOVA, I. G. et al., 2020	<b>Bcl2, Bcl3, Bcl4, Bcl5, Bcl6, Bcl7</b>	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>

Fonte: AUTORA, 2024.

HUANG, et al., (2010) obteve resultados importantes com bacterioclorina bis-quaternizada na inibição de *S. aureus* e com uma bacterioclorina com 6 cargas catiônicas na inibição de *E. coli*. Para inibição de levedura o melhor resultado foi de uma bacterioclorina não catiônica. MESQUITA, et al., (2013) observou que isobacterioclorina catiônica duplamente carregada foi eficaz contra a *E. coli* bioluminescente.

MEEROVICH, et al., (2019) e MEEROVICH et al., (2020) utilizaram bacterioclorinas catiônicas (patente de Dudkin), demonstrando resultados satisfatórios quando utilizado contra linhagens de *P. aeruginosa*. MEEROVICH et al., 2016, MEEROVICH et al., 2018, também obtiveram bons resultados com bacterioclorinas catiônicas na inativação de *P. aeruginosa*. Da mesma forma, estudos realizados por TIGANOVA; ZHIZHIMOVA; PHILIPOVA, (2020) e BALLATORE et al., (2020), obtiveram bons resultados utilizando bacterioclorina bis (espermine), na inativação de *S. aureus*.

Bacterioclorinas podem ser produzidas a partir de bacterioclorofilas extraídas de grupos de bactérias púrpuras não sulfurosas como, por exemplo, a produzida por *Rhodopseudomonas faecalis* (LOPES, 2018; MARTINS et al., 2019; BARBOZA et al. 2021) e *Rhodobacter capsulatus* (MIRANOV, 1996). Possuem características de fotossensibilizadores eficientes pois os estudos com estas moléculas têm demonstrado bons resultados em terapia fotodinâmica (RODRIGUES et al., 2024). Este fato torna interessante a busca por novas fontes de obtenção natural desta molécula.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial biotecnológico de microrganismos pigmentados isolados de sedimentos de ambientes como chorume, fundo de lago e ambiente Antártico, a fim de obter fotossensibilizadores para inativação Fotodinâmica a ser aplicada em leveduras, bactéria Gram-positivas e bactérias Gram-negativas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolamento de microrganismos pigmentados de amostras de ambiente de chorume, ambiente de fundo de lago, e ambiente Antártico;
- Obtenção de moléculas fotossensibilizadoras produzidas por microrganismos isolados;
- Caracterização por métodos moleculares das linhagens de microrganismos isolados que apresentaram potencial biotecnológico.
- Caracterização das moléculas fotossensibilizadoras e realização de modificações estruturais;
- Avaliação da ação fotossensibilizadora dessas moléculas na terapia fotodinâmica em microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e levedura: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* e *Candida albicans*; obtidos de (ATCC – American type culture collection);

## 4 METODOLOGIA

A fonte de iluminação para a Terapia Fotodinâmica dos fotossensibilizadores foi a biotable (MMOPTICS) de 24 poços, com LEDs com iluminação correspondente a 780 nm e intensidade de 24 mW/cm<sup>2</sup>. O liofilizador utilizado para manipulação dos experimentos com microrganismos foi o Liofilizador SL404 da Solab. Os espectros de UV-Vis foram realizados no espectrofotômetro Evolution 201 - Thermo Scientific usando como solvente diclorometano. Estes equipamentos foram utilizados na Universidade Federal da Integração Latino-Americana. As análises de <sup>1</sup>H-RMN foram realizadas no equipamento da Bruker Avance 400 spectrometer at 400.15 MHz for <sup>1</sup>H-RMN. Os espectros de RMN foram realizados na Universidade Federal de São Carlos. Os reagentes foram utilizados sem previa purificação.

### 4.1 CULTIVO DE BACTÉRIAS PÚRPURAS NÃO SULFUROSAS:

A bactéria púrpura *Rhodopseudomonas faecalis* foi cedida pelo laboratório de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Carlos, e cultivada no Laboratório de Biotecnologia Ambiental, em meio líquido (Tabela 02) adaptado de SMITH et al., (2023), com pH em torno de 7, em garrafas de um litro, previamente preparadas e autoclavadas, em temperatura controlada de 37 °C e com lâmpada amarela halógena de 100W, por 7 a 21 dias.

**Tabela 02: Meio de cultura para bactérias púrpuras não sulfurosas.**

Fosfato de Potássio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,5 g/L
Sulfato de Magnésio heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> )	0,3 g/L
Cloreto de Sódio (NaCl)	0,4 g/L
Cloreto de Amônio (NH <sub>4</sub> Cl)	1,2 g/L
Cloreto de Cálcio (CaCl <sub>2</sub> )	0,05 g/L
Extrato de levedura	0,3 g/L
Ácido Málico (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> )	1,0 g/L
Succinato de Sódio (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> )	1,0 g/L
Acetato de Sódio (NaO <sub>2</sub> CCH <sub>3</sub> )	1,0 g/L
Sulfato de Ferro (FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O) 0,15%	0,5 ml/L
Solução traços (HCl, ZnSO <sub>4</sub> , MnSO <sub>4</sub> , H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , CoCl <sub>2</sub> , CuSO <sub>4</sub> , NaMoO <sub>4</sub> em água)	2,0 ml/L

Fonte: AUTORA, 2024

Após o crescimento das culturas, verificado pela coloração púrpura intensa, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos em temperatura de 10 °C e liofilizadas para os procedimentos seguintes.

#### 4.2 CULTIVO DE BACTÉRIAS DAS AMOSTRAS ISOLADAS:

Nove linhagens bacterianas isoladas de amostras coletadas na Baía dos Baleeiros, Ilha Deception (62°58'52"S, 60°39'52"W) arquipélago das Shetland do Sul, noroeste da península Antártica (Figura 10), preservadas no Laboratório de Biotecnologia Ambiental da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), foram selecionadas para o estudo por possuírem coloração laranja ou avermelhada denominadas de BAD 5, BAD21, BAD 22, BAD 23, BAD 29, BAD 30, BAD 33, BAD 41 e BAD 43. As amostras foram reativadas em meio nutritivo (Caldo nutriente – KASVI) e incubadas em meio de cultivo para bactérias púrpuras (Tabela 02), em temperatura de 30 °C e 10° C, sem agitação ou com agitação de 150 rpm, por um período de 30 dias.

A amostra de fundo do lago de Itaipu, foi coletada na cidade de Santa Terezinha de Itaipu no terminal turístico (25° 21' 44" S 54° 29' 17" W) (Figura 10) em dezembro de 2021 com amostrador Van Veen Grab e colocada para crescer em meio nutritivo (Caldo nutriente – KASVI) e o isolamento foi feito em placas de Petri com meio nutritivo. Na placa com meio nutritivo, foram selecionadas duas colônias com coloração laranja e avermelhada que foram denominadas LI1 e LI2. Foram incubadas em meio para bactérias púrpuras (Tabela 02) em temperatura de 30 °C sem agitação por um período de 30 dias.

A amostra de chorume foi coletada no aterro sanitário na cidade de Foz do Iguaçu/PR (25° 32' 52" S 54° 35' 17" O) (Figura 10), armazenada em tubos de plástico tipo Falcon e colocada para crescer em meio nutritivo (Caldo nutriente – KASVI). A seguir, essa amostra foi semeada em placas de Petri com meio nutritivo, e as colônias com coloração púrpuras, denominadas CH1, foram incubadas em meio para bactérias púrpuras (Tabela 02) em temperatura de 30 °C sem agitação por um período de 30 dias.

A amostra coletada na Baía dos Baleeiros, Ilha Deception (62°58'52"S, 60°39'52"W) arquipélago das Shetland do Sul, noroeste da península Antártica (Figura 10) a 95 m de profundidade, no verão de 2022/23, colocada em saco estéril Whirl-pack (Nasco, Ft. Atkinson, WI) e congelada a -20 °C. A seguir, a amostra denominada ID1 foi colocada para crescer em meio nutritivo (Caldo nutriente – KASVI) e a seguir em meio para bactérias púrpuras (Tabela 02) em temperatura de 30 °C e 10 °C, sem agitação, por um período de 30 dias.

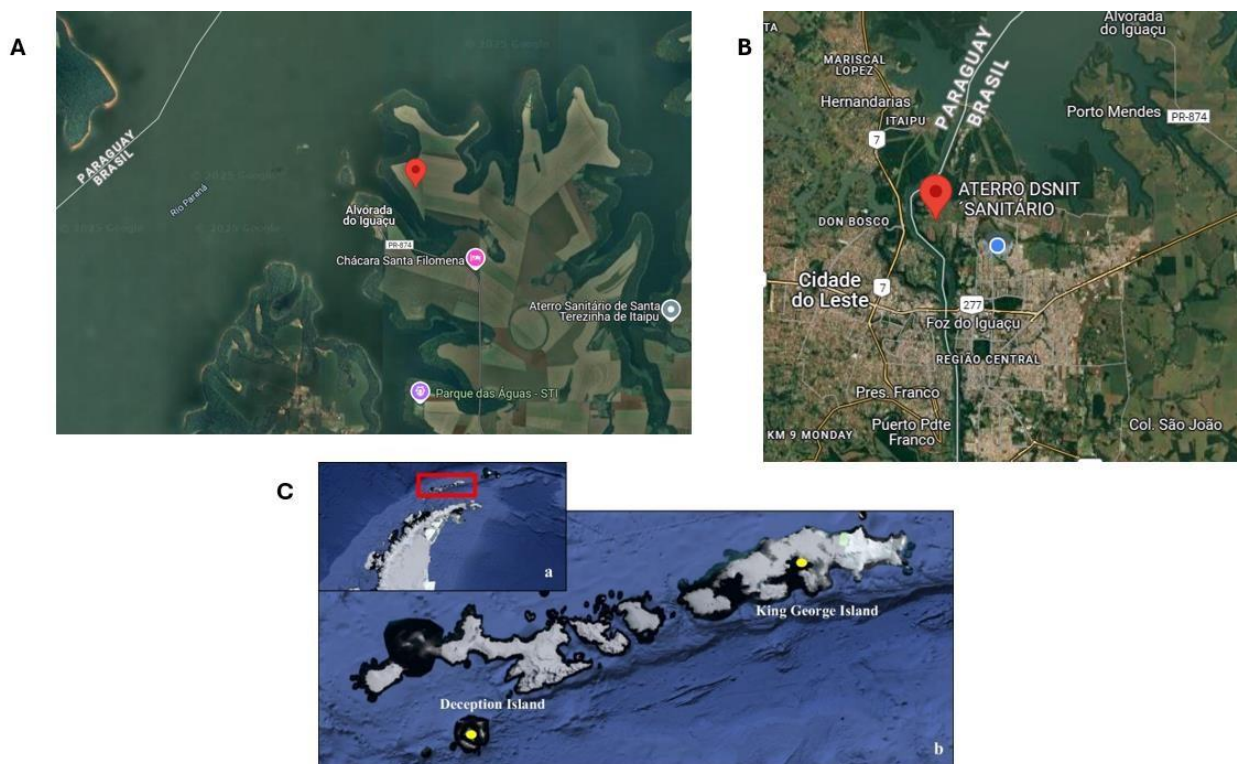


Figura 10: Mapa mostrando os pontos de coleta das amostras. A) amostra de fundo do lago de Itaipu coletada na cidade de Santa Terezinha de Itaipu/PR no terminal turístico B) amostra de chorume coletada no aterro sanitário na cidade de Foz do Iguaçu/PR; C) amostra coletada na Baía dos Baleeiros- Antártica

#### 4.3 EXTRAÇÃO DA BACTERIOCLOROFILA DA BACTÉRIA *R. faecalis*:

A obtenção da bacterioclorina metoxi (Bchl-M) foi realizada segundo a metodologia realizada por PRATAVIEIRA et al., 2021.

#### 4.4 OBTENÇÃO DA BACTERIOCLORINA AMINA (Bchl-Amina):

Bacterioclorina metóxi (10 mg) foi colocada em balão com 16 mL diclorometano e 200  $\mu$ L 3-dimetilamino-1-propilamina (Sigma-Aldrich). A reação permaneceu sob agitação, em atmosfera de argônio e temperatura ambiente durante 32 horas. O derivado de bacterioclorina foi purificado em coluna cromatográfica, usando como eluente diclorometano/metanol (9/1), o composto resultante foi obtido com 74% e caracterizado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear ( $^1\text{H-RMN}$ ).

**<sup>1</sup>H- RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)** δ: 9.31 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 7.60 (m, 1H, CONH), 5.40 (d, 1H); 5.05 (d, 1H), 4.36-4.31 (m, 2H), 4.21-4.26 (m, 2H), 4.18-4.14 (m, 2H), 3.95-3.89 (m, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.21 (s, 3H), 2.72 (m, 2H), 2.59-2.50 (m, 2H), 2.40-2.36 (m, 2H), 2.33 (s, 6H), 2.30-2.24 (m, 2H), 1.85 (d,  $J = 7.4$  Hz, 3H), 1.62 (d,  $J = 7.9$  Hz, 3H), 1.09 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), -1.20 (s, 1H, NH), -1.24 (s, 1H, NH)

**UV-vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):** 751 nm, 519 nm, 356 nm

#### **4.5 OBTENÇÃO DA BACTERIOCLORINA CATIÔNICA (Bchl-Cat):**

Cerca de 14 mg da Bchl-Amina foi colocada em um balão com 2 mL de diclorometano e 100 µL de iodometano, sob agitação, em temperatura ambiente, em um tubo selado, durante 72 horas. A bacterioclorina catiônica foi então recristalizada e caracterizada por <sup>1</sup>H-RMN, obtendo o composto com 90% de rendimento.

**<sup>1</sup>H- RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)** δ: 9.30 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.52 (m, 1H, CONH), 5.26 (d, 1H); 5.04 (d, 1H), 4.35-4.08 (m, 8H), 3.61 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.53 (s, 3H), 3.28 (s, 3H), 3.12 (s, 3H), 2.95 (s, 9H), 2.72 (m, 2H), 2.59-1.99 (m, 6H), 2.84 (d,  $J = 7.4$  Hz, 3H), 1.61 (d,  $J = 7.9$  Hz, 3H), 1.08 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), -1.25 (s, 1H, NH), -1.24 (s, 1H, NH).

**UV-vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):** 753 nm, 529 nm, 356 nm

#### **4.6 EXTRAÇÃO DA BACTERIOCLOROFILA DA BACTÉRIA VERMELHA:**

Para extração da bacterioclorofila, 6,4 g de bactérias obtidas das amostras que apresentaram crescimento em meio de cultura específico para bactérias púrpuras foram tratadas com solução de metanol (150 mL) durante 13 horas em temperatura ambiente, sob atmosfera de nitrogênio e protegida da luz. A mistura reacional foi filtrada em funil de buchner e papel filtro e lavada com diclorometano. O material obtido, na extração foi colocado em balão com 20 mL de diclorometano e 10 mL de uma solução de metanol/ácido sulfúrico 10%. A reação permaneceu sob agitação, temperatura ambiente e atmosfera de argônio durante 8 horas. A reação foi neutralizada com bicarbonato de sódio e lavada no funil de extração com água e extraída com diclorometano. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio, filtrada e rotaevaporada.

#### 4.7 CRESCIMENTO DAS CÉLULAS MICROBIANAS:

Linhas de *Candida albicans* (ATCC 10.231), adquiridas da marca CEFAR e cresceram a 27 °C em caldo Sabouraud da marca KASVI na estufa durante 24 horas. Após foram centrifugadas usando tubos Falcon de 15 mL no tempo de 1 minuto a 3000 rpm e temperatura de 21 °C, e ressuspensas em PBS (phosphate buffered saline) e a suspensão foi ajustada com absorbância de 0.2 em 600 nm em espectrofotômetro.

*Staphylococcus aureus* (ATCC 485) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 489), estavam preservados em criogenia a 20% de glicerol no Laboratório de Biotecnologia Ambiental da UNILA; *Escherichia coli* (ATCC 25.922), e *Salmonella typhimurium* (ATCC 14.028) foram adquiridas da marca CEFAR e cresceram em caldo BHI (Brain Heart Infusion) da marca KASVI durante 24 horas em estufa. Após foram centrifugadas usando tubos Falcon de 15 mL no tempo de 1 minuto a 5000 rpm e temperatura de 21 °C, ressuspensas em PBS e ajustadas na absorbância de 0,1 em 600 nm.

#### 4.8 FOTOINATIVAÇÃO:

Os testes de inativação fotodinâmica foram realizados utilizando dois fotossensibilizadores derivados de bacterioclorofila, a Bacterioclorina Metóxi (Bchl-M) e a Bacterioclorina Catiônica (Bchl-Cat), nas concentrações de 1 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM, 200 µM, 250 µM e doses de luz de 20, 30 e 45 J/cm<sup>2</sup>, para cada microrganismo. Em triplicata, 500 µL do microrganismo foram dispensados em poços de placa de 24 poços e a seguir foram adicionadas soluções contendo os fotossensibilizadores. As placas ficaram protegidas da luz pelo tempo de incubação de 20 minutos, para penetração do fotossensibilizador no interior de cada microrganismo. O grupo controle “Microrganismo” foi mantido no escuro e sem adição de fotossensibilizador durante 20 minutos e depois diluído e semeado em placa. No grupo controle “Luz”, o microrganismo foi irradiado pelo tempo necessário nas doses de luz desejadas e depois diluído e semeado em placa. Para o grupo controle “Fotossensibilizador”, o microrganismo foi incubado com o fotossensibilizador e não recebeu doses de luz. (RODRIGUES et al, 2022).

Em seguida, os microrganismos com os respectivos fotossensibilizadores bacterioclorina metóxi (Bchl-M) ou bacterioclorina catiônica (Bchl-Cat) expostos a luz com auxílio da biotable com iluminação em 780 nm e intensidade de 24 mW/cm<sup>2</sup>. Foram utilizados diferentes tempos de irradiação referentes às diferentes doses de luz, de forma que para a dose de luz de 20 J/cm<sup>2</sup> as amostras foram irradiadas por 14 minutos, para a dose de luz de 30 J/cm<sup>2</sup> as amostras foram

irradiadas por 21 minutos e para a dose de luz de  $45 \text{ J/cm}^2$  as amostras foram irradiadas por 31 minutos. A diluição seriada ( $10^6$ ) foi feita em triplicata com  $100 \mu\text{L}$  do material da placa de 24 poços, incluindo dos grupos controles, transferidos para microtubos contendo  $900 \mu\text{L}$  de PBS (RODRIGUES, 2022).

Em duplicata,  $25 \mu\text{L}$  foram espalhados em placas de Petri contendo ágar BHI para as bactérias e ágar Sabouraud para a levedura. Em todas as etapas deste procedimento as amostras, incluindo os grupos controles, ficaram protegidas de luz. As culturas foram colocadas para crescer em estufa por 24 horas protegidas da luz (levedura temperatura de  $28^\circ\text{C}$  e para bactérias temperatura de  $37^\circ\text{C}$ ) e após foi realizada a contagem das colônias dos microrganismos das placas (RODRIGUES, 2022).

Testes de inativação também foram feitos com a bactéria isolada do chorume. A bactéria foi colocada para crescer 24 horas antes do início dos testes (em meio BHI da marca KASVI), após esse tempo o material foi centrifugado e feita a ressuspensão em PBS. A absorbância foi verificada utilizando o equipamento espectrofotômetro em  $600 \text{ nm}$  em aproximadamente  $0,1$  de absorbância e, a seguir, foram colocados  $500 \mu\text{L}$  do microrganismo em placas de 24 poços. O microrganismo foi exposto a luz após o tempo de incubação com auxílio da biotable com iluminação em  $780 \text{ nm}$  e intensidade de  $24 \text{ mW/cm}^2$  com doses de luz de  $20 \text{ J/cm}^2$ ,  $30 \text{ J/cm}^2$  e  $45 \text{ J/cm}^2$ , seguido de diluição seriada, espalhamento em placa de Petri, incubação em estufa por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  e contagem de colônias como descrito acima. Neste teste só foi feito um grupo controle (somente Microrganismo, sem exposição a luz) e não foi utilizado nenhum fotossensibilizador.

#### **4.9 ANÁLISE GENÉTICA DAS AMOSTRAS ISOLADAS:**

As amostras isoladas que exibiram crescimento em meio de cultivo específico para bactérias púrpuras não sulfurosas foram enviadas para análise genética para empresa Gogenetic que realiza o método GG-BM029 de identificação de microrganismos por sequenciamento de DNA (16S) com confiança de 99%.

#### **4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS:**

Os dados estatísticos foram obtidos pelo software Rstudio 2024.09.0. Foi realizada Análise de Variância (ANOVA) onde foram observados os valores de significância de  $p$  e de  $F$ , além do valor do  $F$  Crítico. E foi feita a comparação entre os grupos através do teste de Tukey (TEAM, 2024).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 CRESCIMENTO DAS AMOSTRAS ISOLADAS

Com o objetivo de obter novos fotossensibilizadores a partir de bactérias, foram utilizadas 9 amostras isoladas da ilha Deception na Antártica. Estas amostras foram denominadas BAD 23, BAD 41, BAD 43, BAD 29, BAD 30, BAD 22, BAD 5, BAD 33 e BAD 21, foram escolhidas devido sua coloração vermelha ou laranja, uma vez que os pigmentos do tipo bacterioclorina apresentam esta coloração. Após reativação em caldo BHI, não apresentaram crescimento no meio de cultivo de bactérias púrpuras nem em 30 °C e em 10 °C, mesmo com agitação de 150 rpm, por um período de 30 dias (Tabela 3).

MADIGAN et al., (2000) descreveu uma nova espécie de bactéria púrpura não sulfurosa, da espécie, *Rhodoferox antarcticus*, isolada do ambiente Antártico, de um lago permanentemente congelado, o lago Lake Fryxell. Esta bactéria possui coloração laranja, e cresce em faixa de temperatura de 0 °C a 25 °C e temperatura ideal de 15 °C a 18 °C. Possui bacterioclorofila *a* e carotenóides, os espectros de absorção apresentam bandas entre 769 nm para extratos em metanol a 855 nm para extratos de células intactas (KARR et al., 2003, MADIGAN et al., 2000). Esta característica de faixa de absorção e presença de bacterioclorofila *a* torna essa espécie de microrganismo importante para utilização em terapia fotodinâmica, que alcançaria um dos objetivos deste estudo que seria encontrar fontes alternativas de bacterioclorinas a serem usadas na fotoinativação de bactérias e leveduras. Entretanto, as amostras testadas neste ensaio, não apresentaram nenhum microrganismo que cresceu no meio de cultura específico das bactérias púrpuras, mesmo em temperaturas de 10 °C que estariam dentro da faixa de crescimento descrita por MADIGAN et al., (2000). Ensaio na faixa de temperatura descrita como ideal, de 15 °C a 18 °C, não foram realizados, visto que por escolha de metodologia a temperatura de testes foi de 10°C e 30°C para amostras provenientes do continente Antártico e, portanto, poderiam apresentar resultados melhores para o crescimento do microrganismo de interesse.

JUNG et al., (2004) em seu estudo com *Rhodoferox antarcticus*, utilizou enriquecimento com extrato de levedura na própria amostra coletada do lago Lake Fryxell e após incubação a 4 °C, as amostras foram repicadas em meio de cultura para bactérias púrpuras em condições anaeróbicas, temperatura de 15 °C a 20 °C e na ausência de luz. O meio de cultura utilizado nos dois estudos acima, foi descrito por TAYEH; MADIGAN (1987) e é muito semelhante ao utilizado neste ensaio (Tabela 02), visto que contém sulfato de amônio, cloreto de cálcio, fosfato de potássio, sulfato de magnésio, ácido málico, extrato de levedura e elementos traços. Em um estudo com *Rhodoferox antarcticus*, BAKER et al., (2017), descreveu genes fotossintetizantes de

bacterioclorofila a que são ativados em condições metabólicas anaeróbias ou aeróbias. Essa versatilidade permite que o microrganismo sobreviva em condições variadas de níveis de oxigênio e de luz do ambiente Antártico.

Outros microrganismos do ambiente antártico com coloração púrpura ou roxa isolados ou testados em consórcios, foram descritos em estudos, mas os espectros de absorção encontram-se em torno de 575 nm, ou seja, provavelmente não seriam derivados da bacterioclorofila e não entrariam no âmbito de fotossensibilizadores deste estudo (HUANG et al., 2012; ALEM et al., 2020; MOJIB et al., 2010), pois esta classe de compostos apresentam uma banda característica acima de 750 nm.

Em um estudo genômico com biofilme coletado na Ilha Deception, foi observada a presença de genes que codificam todas as enzimas para produzir pigmentos fotossintéticos de bactérias fototróficas, as bacterioclorofilas e as clorofilas na via metabólica da porfirina (CENTURION et al., 2022). As bactérias púrpuras são microrganismos muito versáteis metabolicamente, pois podem desempenhar um papel importante no ambiente através da capacidade de degradação de compostos tóxicos, e da utilização de compostos orgânicos não fermentáveis e da capacidade de fixar nitrogênio (MADIGAN; JUNG, 2009). Entretanto, neste estudo não foi observado crescimento de microrganismos provenientes da amostra da Ilha Deception (ID1) em meio de cultivo para bactérias púrpuras nas temperaturas de 30 °C e 10 °C, no período de 30 dias.

Também foram avaliadas amostras de fundo do lago de Itaipu, LI1 e LI2 (Tabela 03) que apresentaram crescimento em meio de cultivo para bactérias púrpuras, mas o crescimento não era semelhante ao observado na cultura de *Rhodospseudomonas faecalis*, e, além disso, a coloração de ambas as culturas se apresentou roxa e seu extrato apresentou absorção em 500 nm, o que provavelmente não contém compostos do tipo bacterioclorina. Esta coloração é descrita em alguns trabalhos onde foram coletadas amostras de sedimentos de lagos e as bactérias isoladas foram identificadas dentro dos gêneros *Rhodospseudomonas* e *Rhodoferax*. Um estudo isolou cerca de 60 genótipos de amostras de bactérias não sulfurosas de sedimentos de lagos na Holanda, sendo que destas, a grande maioria eram *Rhodospseudomonas palustres* e *Rhodoferax fermentans* (ODA et al., 2002). NALVOTHULA et al., (2022) isolou *R. palustres* e *R. faecalis* de amostras de solo contaminado com óleo na Índia. Portanto, as amostras de fundo de lago coletadas no lago de Itaipu em Santa Terezinha de Itaipu, poderiam ter potencial de isolamento de algumas espécies de bactérias púrpuras não sulfurosas visto que a coloração roxa foi evidente e diferenciada da observada na cultura de *R. faecalis*.

Uma vez que não foi possível obter bactérias que produzissem bacterioclorofila nas amostras coletadas da Antártica, e do lago de Itaipu, decidiu-se então analisar amostras de chorume. Foi analisada a amostra denominada CH1 (Tabela 3). A amostra CH1 apresentou crescimento em

meio de cultivo para bactérias púrpuras com crescimento semelhante ao observado na cultura de *Rodospseudomonas faecalis* com coloração vermelha. *R. faecalis*, é uma bactéria púrpura não sulfurosa, descrita por ZHANG et al., (2002) de amostras isoladas de reator anaeróbico de digestão de fezes de frangos, e, sendo também isolada uma cepa de *R. faecalis* de efluente de esgoto suíno no Japão (OKUNISHI, et al., 2016).

**Tabela 03: Resultado do crescimento das linhagens bacterianas para obtenção de fontes alternativas de bacterioclorinas.**

AMOSTRAS	Crescimento da Colônia	Coloração da Colônia	Espectro de UV-VIS da extração	Presença de Bacterioclorofila
BAD 5	-	-	-	-
BAD 21	-	-	-	-
BAD 22	-	-	-	-
BAD 23	-	-	-	-
BAD 29	-	-	-	-
BAD 30	-	-	-	-
BAD 33	-	-	-	-
BAD 41	-	-	-	-
BAD 43	-	-	-	-
LI 1	+	Roxa	500 nm	-
LI 2	+	Roxa	500 nm	-
CH 1	+	Vermelha	750 nm	+

Fonte: AUTORA, 2024.

## 5.2 OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS MOLÉCULAS

As amostras CH1, LI1 e LI2 que apresentaram coloração vermelha e roxa (Tabela 03) seguiram para as próximas etapas do estudo e foram cultivadas, centrifugadas, liofilizadas e submetidas a extração do pigmento com absorção desejada.

O espectro em UV-Vis das moléculas extraídas das amostras LI1 e LI2 (coloração roxa) indicaram uma banda de absorção em torno de 500 nm que não é característico das bacterioclorofilas e, portanto, estas amostras foram descartadas da etapa subsequente do estudo. O espectro UV-Vis da molécula extraída da amostra CH1 (coloração vermelha) apresentou banda de absorção em torno de 750 nm indicando possivelmente a presença de bacterioclorina. Com picos de absorção de 753 nm, 529 nm e 360 nm quando dissolvida em diclorometano (Figura 11).

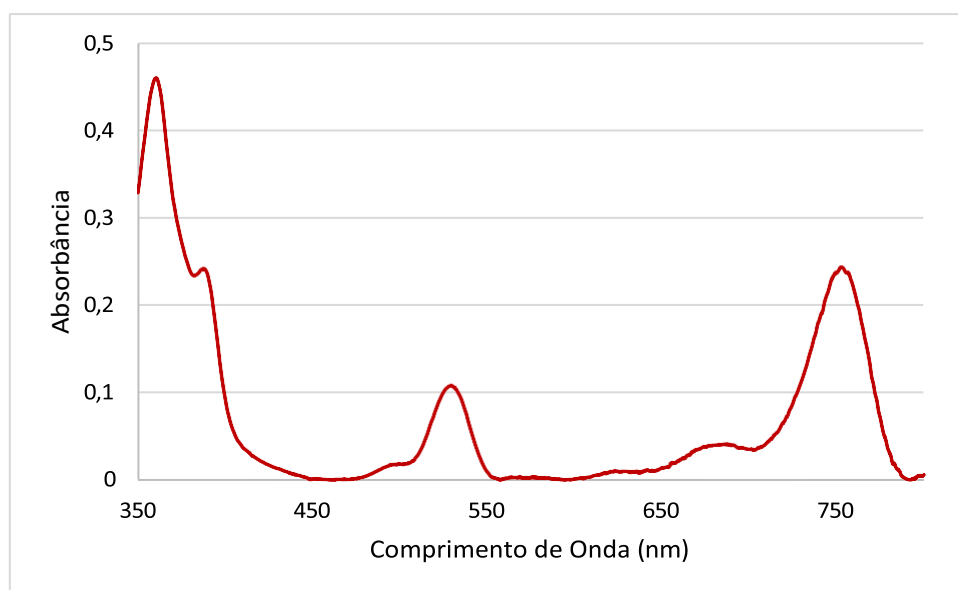


Figura 11: Espectro UV-VIS do extrato da amostra dissolvida em diclorometano da amostra de churume (CH1). Apresentando banda em comprimento de onda em torno de 753nm. Além das bandas 529 nm e 360 nm  
Fonte: AUTORA, 2024.

A amostra CH1 foi enviada para análise genética e o resultado de identificação de microrganismos por sequenciamento de DNA (16S) demonstrou com 99% de similaridade com outras linhagens de banco de dados que, o isolado não era uma bactéria púrpura não sulfurosa e sim uma enterobactéria, *Serratia* sp.

Neste estudo, que busca por novos microrganismos produtores de precursores de bacterioclorinas, onde a banda de absorção desejada é por volta de 750 nm, encontrar um microrganismo que produz uma molécula com banda nessa faixa de absorção atingiria um dos objetivos do estudo. No entanto, como o resultado da análise genética resultou em um microrganismo possível patógeno do ser humano, não foi interessante continuar com os experimentos de cultivo do microrganismo e consequente produção de moléculas para as etapas seguintes, pois, além disso, os estudos com este microrganismo relatam apenas a presença de uma molécula denominada prodigiosina que possui faixa de absorção entre 520 nm e 540 nm (JI; JEONG; KIM; LINDSEY, 2015; AMIM et al., 2022; JARDAK et al., 2022). Importante destacar que a análise de UV-Vis da molécula extraída da amostra de CH1 também possui um pico de absorção de 529 nm que pode ser da molécula de prodigiosina descrita pela literatura.

A análise da literatura disponível destaca que *Serratia marcescens*, e *Serratia* sp. que prodigiosina apresenta atividades antitumorais, antibacterianas, antifúngicas, entre outras atividades de interesse clínico e que tem demonstrado potencial no desenvolvimento de medicamentos para tratamento de diversas doenças (JIMTHA et al., 2017; HAN et al., 2021, ZHAO

et al., 2021, NIE et al., 2023; LAZIC et al., 2022). Também foram descritos estudos de inativação fotodinâmica em microrganismos como *S. aureus*, MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina), *P. aeruginosa*, *E. coli*, e biofilme de *Staphylococcus epidermidis* (JI; JEONG; KIM LINDSEY, 2015; AMIM et al., 2022; JARDAK et al., 2022). Prodigiosina foi isolada de microrganismos do gênero *Serratia* de diversos tipos de ambientes como sedimentos de lagos, sedimentos marinhos, amostras de solos contaminados com pesticidas e de plantações de grãos (HAN et al., 2021). Muitos estudos têm tentado selecionar cepas originais e otimizar as condições de produção e regulação genética para melhorar a estrutura e a função do prodigiosina. No entanto, o custo de produção ainda é alto devido à dificuldade no processo de purificação e separação da molécula (HAN et al., 2021).

Em busca de esclarecimento para a presença da molécula com característica de bacterioclorofila na amostra CH1, a análise de comparação da via de síntese da molécula de prodigiosina conforme HAN et al. (2021), com a via de síntese da bacterioclorofila conforme CHEN; BOCIAN; LINDSEY (2014), não demonstrou a existência de moléculas em comum nas duas vias de síntese.

Desta forma, apesar das tentativas de isolamento de uma nova bactéria para obtenção de bacterioclorina de amostras derivadas dos ambientes antártico, do lago de Itaipu e do chorume de aterro sanitário, não foi possível obter um microrganismo produtor de moléculas com potencial para serem usadas como fotossensibilizadores na faixa de absorção ideal para a inativação fotodinâmica de microrganismos. Desta forma, o estudo foi encaminhado para utilização da bactéria *Rhodopseudomonas faecalis*, já utilizada nos estudos do grupo de pesquisa. As modificações estruturais para deixar a molécula catiônica, foram feitas com a bacterioclorina extraída desse microrganismo e a molécula catiônica foi avaliada frente aos testes de fotoinativação de microrganismos.

### 5.3 OBTENÇÃO DAS BACTERIOCLORINAS MODIFICADAS

A bactéria *Rhodopseudomonas faecalis* foi cultivada no laboratório, centrifugada e liofilizada. O pigmento da bactéria foi extraído com metanol e ácido sulfúrico (10%), neutralizado e na sequência diluído com diclorometano na presença de metanol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% em atmosfera de argônio durante 8 horas. Obtendo-se a bacterioclorina metoxi (Bchl-M) segundo a metodologia descrita por PRATAVIEIRA et al., (2021). Após a obtenção da bacterioclorina Bchl-M, foram realizadas modificações estruturais visando obter uma bacterioclorina catiônica, com o objetivo de



Após a obtenção da bacterioclorina metoxi (Bchl-M), foi caracterizada por ressonância magnética nuclear e comparada com a literatura (PRATAVIEIRA, et al., 2021). Pode-se observar no espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (Figura 13), os três sinais em aproximadamente 8 ppm são característicos dos H aromáticos, os três sinais integram para 1H. Em 6,08 ppm corresponde a 1H do anel de 5 membros, vizinho a carbonila (destacado em vermelho). Os 5 singletos que integram para 3H cada, na região de 3,1 até 3,8 ppm correspondem as 5 metilas. A bacterioclorina não se encontra complexada com nenhum metal uma vez que apresenta os dois H ligados aos anéis pirrólicos em -0,96 e 0,46 ppm, bem característico de compostos porfirinóides.

A bacterioclorina Bchl-Amina foi obtida pela reação entre a bacterioclorina metoxi (Bchl-M) com a 3 dimetil amino-1-propil amina, durante 32 horas a temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por placa cromatográfica e na sequência extraída e purificada em coluna cromatográfica. Obtendo-se a bacterioclorina (Bchl-Amina) em 74% de rendimento. A Bchl-Amina foi caracterizada por ressonância magnética nuclear (Figura 14), onde podemos observar sinais bem característicos desta molécula, uma vez que os sinais dos 3H aromáticos da Bchl-M permaneceram na mesma região (aproximadamente 8 ppm). No entanto o sinal de 1H em 6,08 ppm da Bchl-M foi deslocado para 5,40 (1H) e 5,05 (1H) o que evidencia a abertura deste ciclo de 5 membros. Outra evidencia que a amina foi adicionada na molécula de bacterioclorina, formando uma amida, é o sinal 7,60 ppm (destacado em azul) que é característico de amida, integrando para 1H. Também é possível observar neste espectro as duas metilas (destacada em verde) ligada ao nitrogênio da amina que foi adicionada na bacterioclorina, na forma de singlete, integrando para 6H em 2,33 ppm.

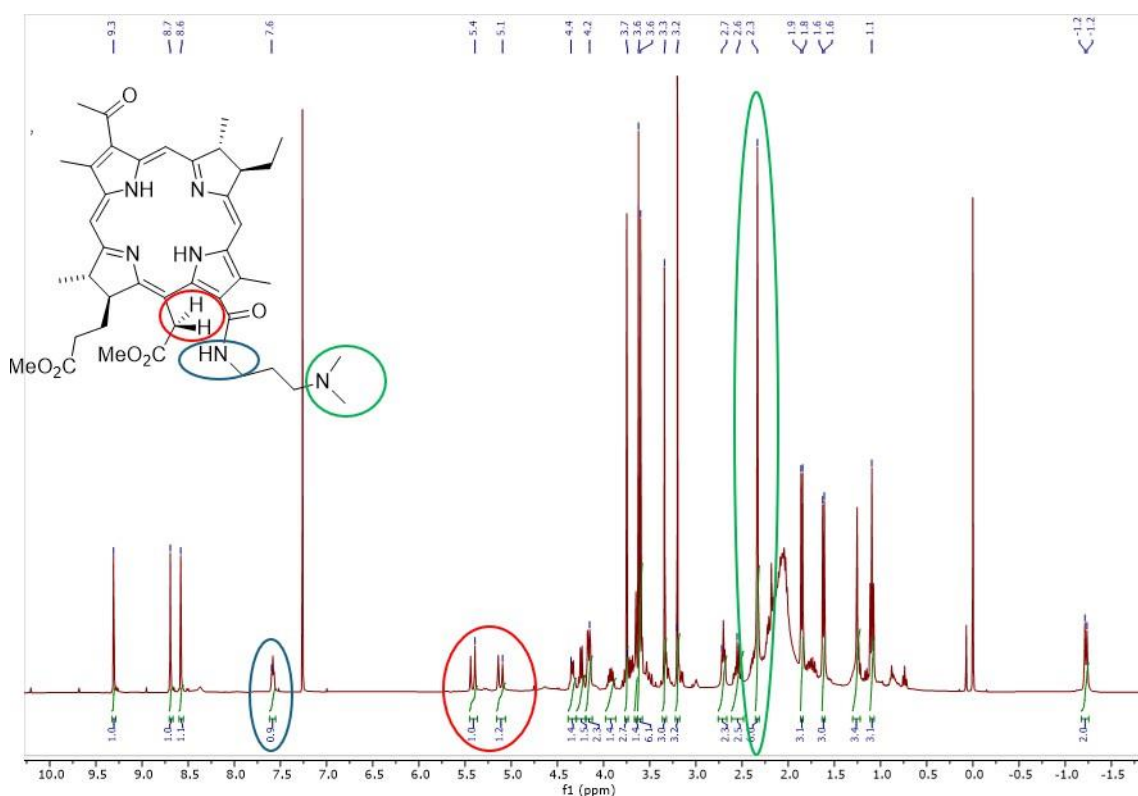


Figura 14: Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  da bacterioclorina Bchl-Amina. Fonte: AUTORA, 2024.

A bacterioclorina obtida Bchl-Amina, também foi avaliada por espectroscopia de UV-vis, onde a amostra foi dissolvida em diclorometano. Pode-se observar que a bacterioclorina continua com a banda de absorção na região de 751 nm (Figura 15), o que é desejável para este estudo, além de picos de 519 nm e 356 nm, característicos da bacterioclorina (RODRIGUES et al., 2024).

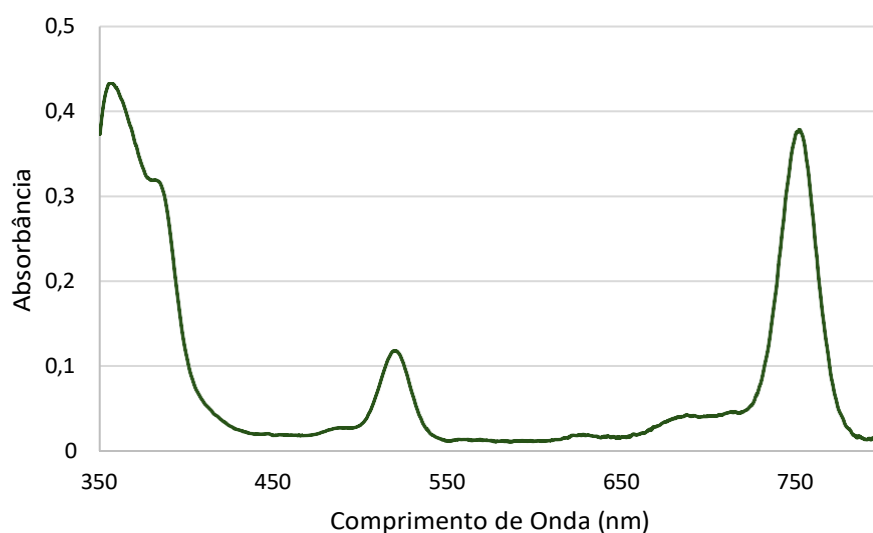


Figura 15: Espectro UV-VIS da Bacterioclorina Amina (Bach Amina) em diclorometano. Apresentando banda em comprimento de onda em torno de 751nm. Além dos picos de 519 nm e 356 nm. Fonte: AUTORA, 2024.

A reação de cationização, foi realizada com iodeto de metila durante 72 horas, e resultou em rendimento de 90%. Esta reação foi possível de ser confirmada uma vez que a polaridade deste composto aumentou (identificado em placa cromatográfica) e se observou o deslocamento das duas metilas da amina que antes estava em 2.33 ppm que integra para duas metilas (6H), e, após a metilação da amina ocorreu um deslocamento deste sinal para 2.95 ppm (destacado em vermelho) o qual integra para 3 metilas (9H) conforme figura 16.

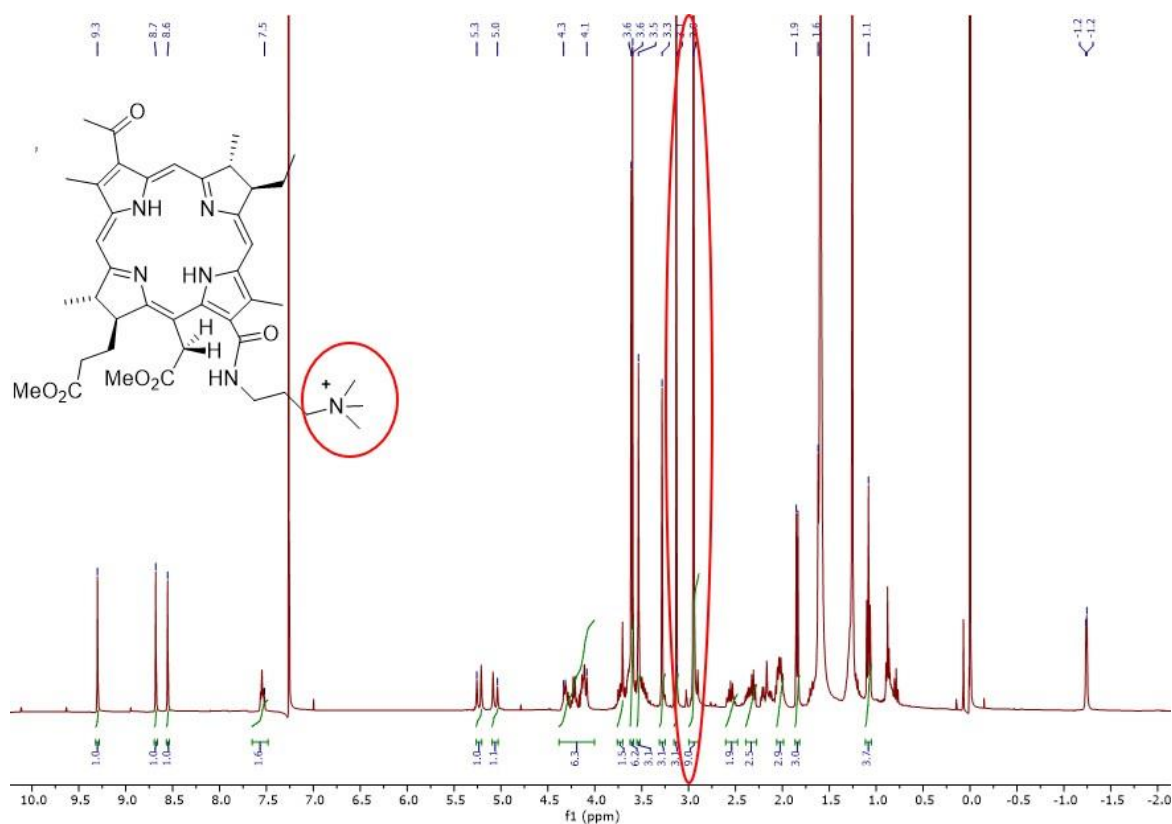


Figura 16: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN da bacterioclorina catiônica Bchl-Cat. Fonte: AUTORA, 2024.

Após a caracterização da Bchl-Cat, a molécula foi avaliada frente a espectroscopia de UV-Vis (Figura 17). Este espectro de absorção mostra que a banda de bacterioclorina permaneceu em 753 nm. Com picos de absorção de 529 e 359 nm característicos da molécula de bacterioclorina.

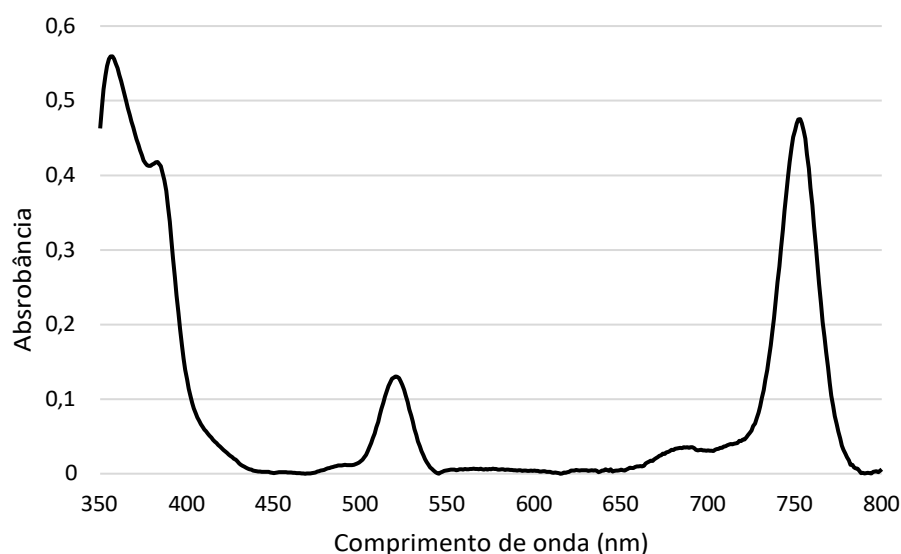


Figura 17: Espectro UV-VIS da Bacterioclorina Catiônica (Bchl-Cat) em diclorometano. Apresentando banda em comprimento de onda em torno de 753 nm. Com picos de 529 nm e 359 nm. Fonte: AUTORA, 2024.

As moléculas de Bchl-M e Bchl-Cat obtidas na semi-síntese (figura 18) foram avaliadas frente a inativação de microrganismos.

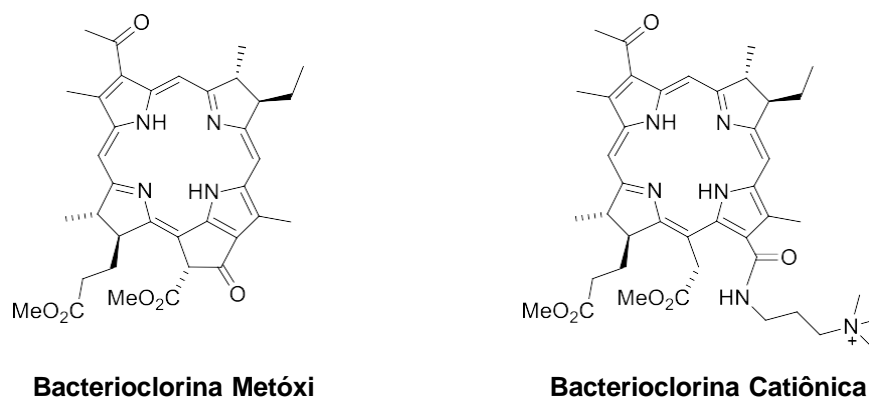


Figura 18: Bacterioclorinas Bchl-M e Bchl-Cat. Fonte: AUTORA, 2024.

O gráfico da figura 19 mostra a comparação do espectro de varredura de UV-vis das bacterioclorinas Bchl-M e Bchl-Cat, dissolvidas em PBS (a) e em diclorometano (b). Onde a Bchl-Cat está representada em preto e com Bchl-M em vermelho. As bandas são muito semelhantes para os dois compostos analisados, demonstrando que a cationização não altera significativamente a banda de absorção. Podemos observar um pequeno alargamento na banda de absorção em aproximadamente 750 nm quando dissolvida em PBS (meio em que foi realizado os ensaios *in vitro*), no entanto não desloca a banda de forma considerável, permitindo que os ensaios pudessem ser realizados com uma fonte de luz de 780 nm.

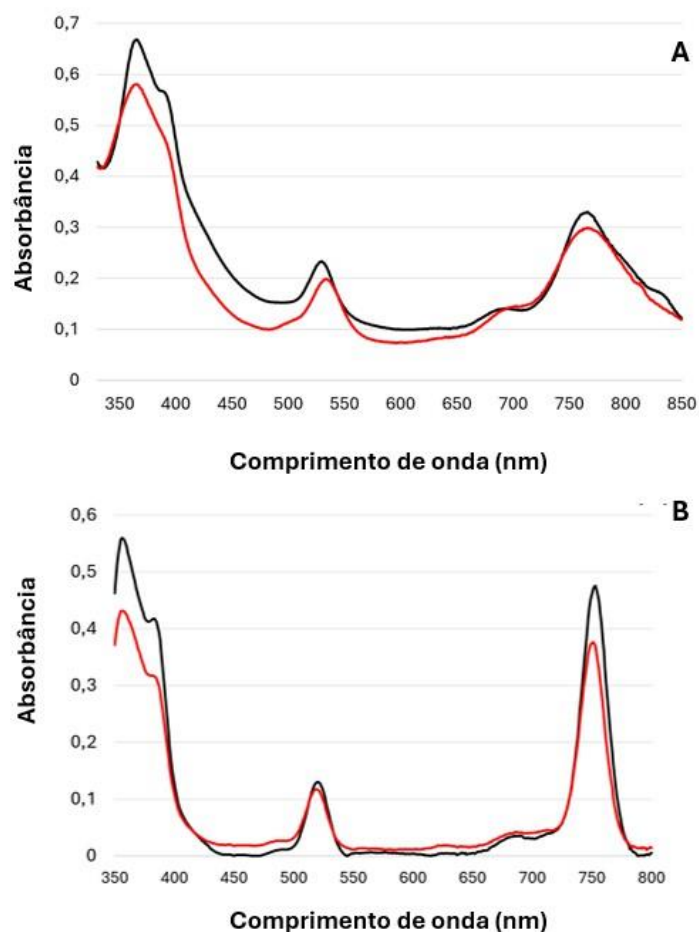


Figura 19: Espectro UV-VIS de bacterioclorinas: Bchl-Cat (preto) e Bchl-M (vermelho) em PBS (a) e em diclorometano (b). Fonte: AUTORA, 2024.

O gráfico da figura 20 mostra a fotodegradação das bacterioclorinas Bchl-M e Bchl-Cat dissolvidas em diclorometano, ambas foram irradiadas de 1 em 1 minuto até completar o tempo de 31 minutos, que corresponde ao tempo de incubação dos fotossensibilizadores submetidos a dose de luz de  $45 \text{ J/cm}^2$ , que é a maior dose de luz testada nos microrganismos deste estudo. O estudo de fotodegradação é muito importante, uma vez que ele avalia o quanto o fotossensibilizador é degradado pela luz. Podemos observar que tanto a Bchl-M e Bchl-Cat apresentam fotodegradação similar e que, após ser irradiada com  $45 \text{ J/cm}^2$ , ainda apresenta banda de absorção em 750 nm, o que demonstra que não foi completamente fotodegradada.

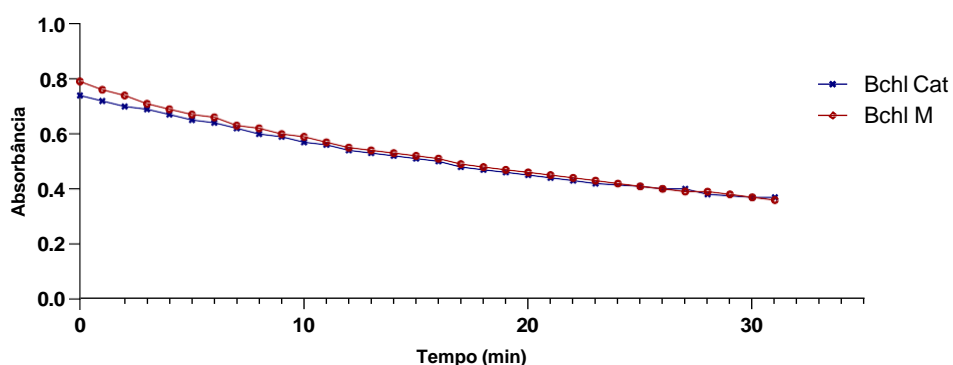


Figura 20: Fotodegradação de Bchl-Cat e de Bchl-M em diclorometano irradiado a 780 nm por 31 min, o que corresponde a 45 J/cm<sup>2</sup>.

## 5.4 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA

Após a síntese da bacterioclorina catiônica, foram iniciados os testes de inativação dos microrganismos e, para efeitos de comparação, foram utilizadas a bacterioclorina catiônica (Bchl-Cat) e a bacterioclorina metoxi (Bchl-M), pois, comparando Bchl-Cat com Bchl-M é possível entender o efeito da modificação estrutural com a inativação causada em cada microrganismo. Os microrganismos selecionados foram *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*.

### 5.4.1 *Pseudomonas aeruginosa*

No experimento com o microrganismo Gram-negativo *P. aeruginosa*, foram avaliados dois fotossensibilizadores do tipo bacterioclorina. A bacterioclorina métoxi, denominada Bchl-M e a bacterioclorina catiônica, denominada Bchl-Cat, ambos nas concentrações de 25, 50 e 100 µM foram avaliadas, a fim de avaliar o efeito da dose de luz, foram utilizadas doses de 30 e

45J/cm<sup>2</sup>, conforme Figura 21.

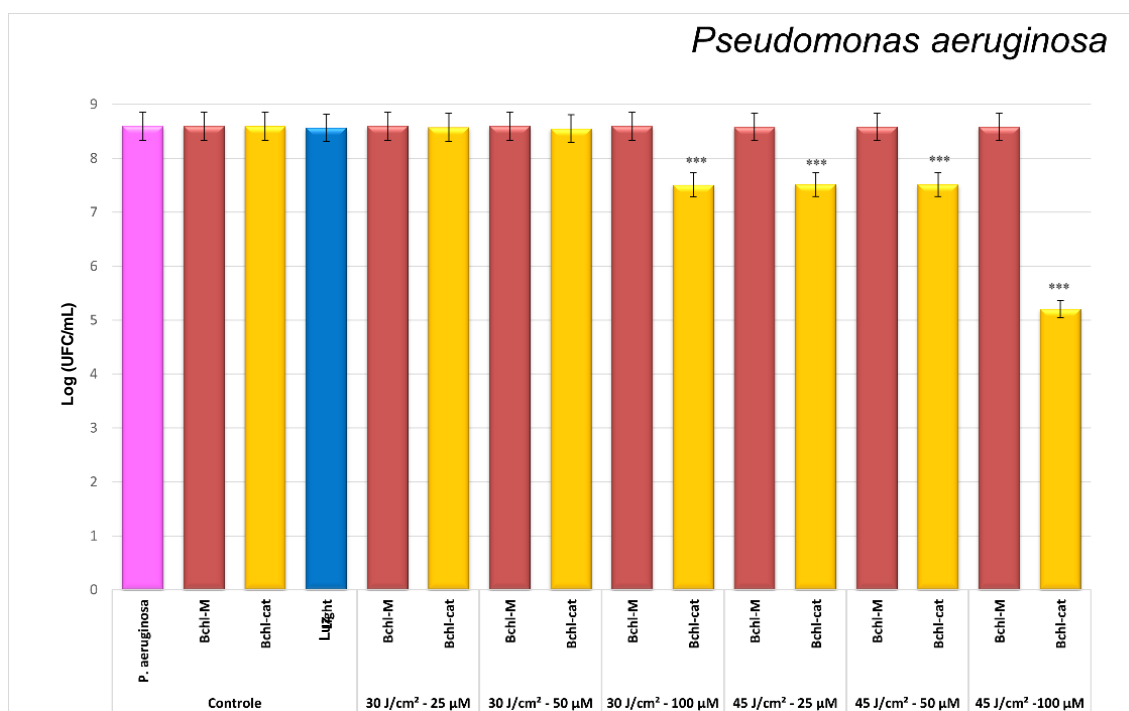


Figura 21: Gráfico da fotoinativação de *P. aeruginosa* com 30 e 45 J/cm<sup>2</sup>. Bchl-M e Bchl-Cat, nas concentrações de 25, 50 e 100 µM. Controle: *P. aeruginosa* (somente microrganismo); Bchl-M e Bchl-Cat (microrganismo + PS a 100 µM, sem luz) e luz (micro-organismo + luz a 45 J/cm<sup>2</sup>). Os resultados indicados com (\*\*\*) diferem significativamente do controle de *P. aeruginosa* a um nível de significância de  $p < 0,05$ . Fonte: AUTORA, 2024.

Os resultados do experimento com *P. aeruginosa*, nas concentrações dos fotossensibilizadores de 25, 50 e 100 µM, e nas doses de luz de 30 e 45 J/cm<sup>2</sup>, podem ser observados na figura 21. O grupo controle *P. aeruginosa* possui somente o microrganismo sem fotossensibilizador e sem dose de luz. No grupo controle Luz, não há presença de fotossensibilizadores somente o microrganismo e a dose máxima de luz. Nos grupos controle Bchl-M e controle Bchl-Cat, não há presença de luz, somente do microrganismo e dos fotossensibilizadores. Nesses quatro grupos, o crescimento do microrganismo é significativo e, portanto, podemos destacar que a presença somente da dose de luz, ou somente dos fotossensibilizadores não é capaz de inativar *P. aeruginosa*. A inativação necessita de ambos os componentes, presença de um fotossensibilizador e de doses de luz no comprimento de onda de 780 nm.

O fotossensibilizador Bchl-M não inibiu *P. aeruginosa* em nenhuma das concentrações e em nenhuma das doses de luz. O fotossensibilizador catiônico Bchl-Cat inibiu o crescimento de *P. aeruginosa* em cerca de 1 log na concentração 100 µM e dose de luz de 30 J/cm<sup>2</sup> e nas concentrações de 25 e 50 µM e dose de luz de 45 J/cm<sup>2</sup>. Na concentração de 100 µM e dose de

luz de 45 J/cm<sup>2</sup> a inibição alcançou cerca de 3 logs. Esses resultados apresentaram alta significância quando comparados aos grupos controle, com  $p < 0,05$  teste estatístico ANOVA, e, portanto, sugerem que existem diferenças significativas entre estes grupos. Resultados observados por AKHLYUSTINA, et al., (2019) descrevem inativação de *P. aeruginosa* com fotossensibilizador policatiônico derivado de bacterioclorina sintética na concentração de 100 µM e dose de luz de 25 J/cm<sup>2</sup>. Biofilme de *P. aeruginosa* foi inativado em 6 logaritmos na concentração de 250 µM e dose de luz de 100 J/cm<sup>2</sup> com uma bacterioclorina sintética policatiônica (TIGANOVA; ZHIZHIMOVA; PHILIPOVA, 2020). Bacterioclorinas catiônicas sintéticas na concentração de 5µM e dose de luz de 8 J/cm<sup>2</sup>, demonstraram ser eficazes em biofilmes de *P. aeruginosa*, e dose de luz de 75 J/cm<sup>2</sup> e concentração de 1mM de bacterioclorina tetracatiônica sintética resultaram em inibição de *P. aeruginosa*, bem como de seu biofilme (MEEROVICH et al., 2016; MEEROVICH et al., 2018).

O fotossensibilizador Bchl-M não causou inativação de *P. aeruginosa* neste estudo e estes resultados confirmam os obtidos por RODRIGUES et al., (2024), onde também não foi observada inativação de *P. aeruginosa*, por esse fotossensibilizador.

Estes dados sugerem que para inativação de bactéria Gram-negativa, como é o caso de *P. aeruginosa*, o fotossensibilizador bacterioclorina necessita de porções catiônicas em sua molécula, visto que o fotossensibilizador Bchl-M não inativou o microrganismo. Inclusive, quanto mais cargas catiônicas, melhor é a inativação de microrganismos, visto que os resultados de inativação mencionados acima, referem-se a concentrações menores de fotossensibilizador, bem com doses menores de luz do que os obtidos neste trabalho, onde Bchl-Cat possui apenas uma carga catiônica. Além disso, a comparação dos resultados da presença de porção catiônica de Bchl-Cat com Bchl-M, mostra uma melhor atividade do fotossensibilizador catiônico.

Outros fotossensibilizadores são capazes de inibir *P. aeruginosa*, e, entre eles podemos citar a curcumina e azul de metileno. Esses fotossensibilizadores são citados por Law, Leung, e Xu, 2023, em uma revisão que reúne alguns exemplos de moléculas capazes de inibir microrganismos Azul de metileno e azul de toluidina também demonstraram potencial de inativação de *P. aeruginosa* (PLANAS et al., 2015; ANJU et al., 2019).

### 5.4.2 *Staphylococcus aureus*

O segundo microrganismo avaliado foi a bactéria Gram-positiva *S. aureus*, e, para tanto, foram utilizadas duas bacterioclorinas, Bchl-M e Bchl-Cat nas concentrações de 1 e 50  $\mu\text{M}$ . A fim de avaliar o efeito da dose de luz, foram utilizadas doses de 20, 30 e 45  $\text{J}/\text{cm}^2$ , conforme o gráfico da Figura 22.

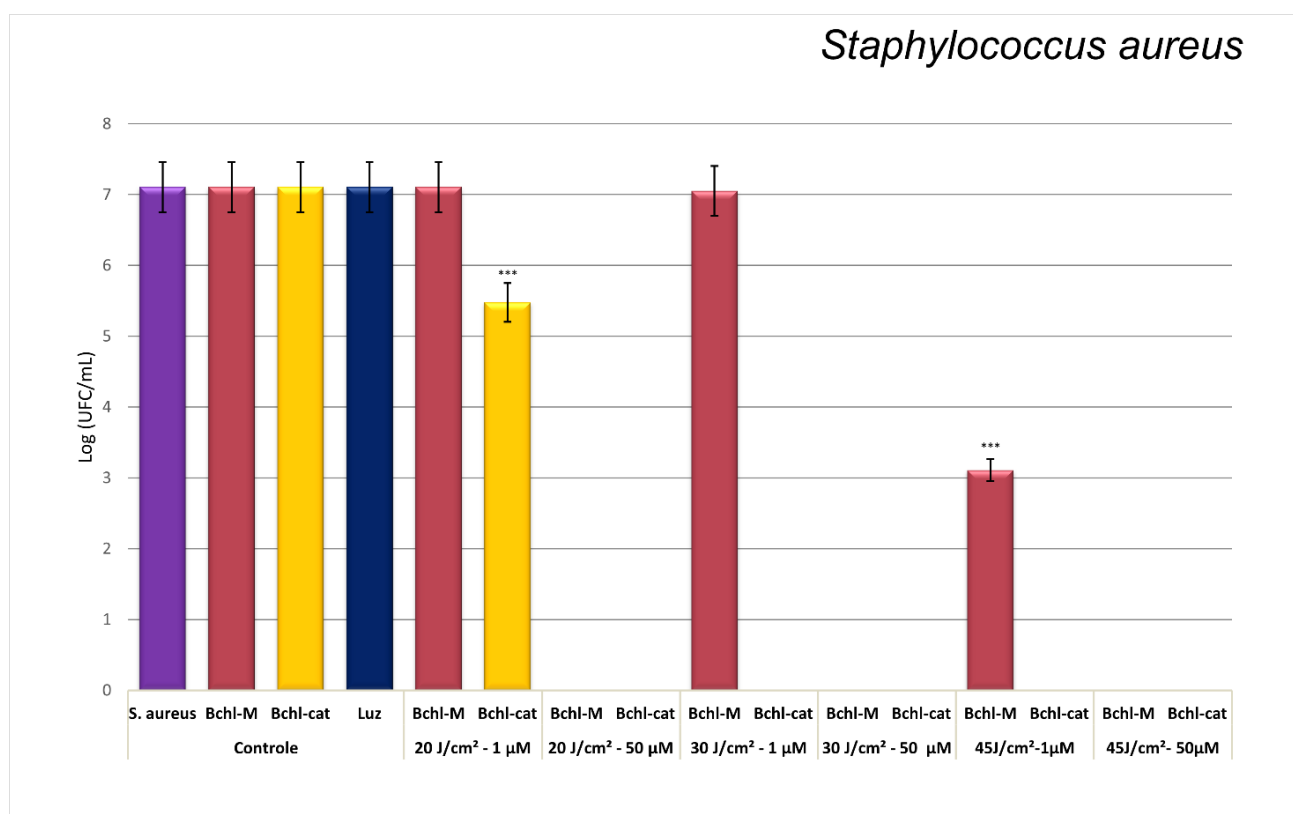


Figura 22: Fotoinativação de *S. aureus* com 20, 30 e 45  $\text{J}/\text{cm}^2$  usando os fotossensibilizadores (PS) Bchl-M e Bchl-Cat em diferentes concentrações 1 e 50  $\mu\text{M}$ . Controle: *S. aureus* (somente microrganismo); Bchl-M e Bchl-Cat (microrganismo + PS a 50  $\mu\text{M}$ , sem luz) e luz (microrganismo + luz a 45  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Os resultados dos experimentos indicados com (\*\*\*) diferem significativamente do controle de *S. aureus* no nível de significância  $p < 0,05$ . Fonte: AUTORA, 2024.

É importante observar que nos grupos controle, a presença somente dos fotossensibilizadores e ausência de luz, não causa inativação de *S. aureus*, assim como não ocorre inativação de *S. aureus* na presença somente de dose de luz. Portanto, a inativação necessita de ambos os componentes, presença de um fotossensibilizador e de doses de luz no comprimento de onda de 780 nm.

Os resultados obtidos para a bactéria Gram-positiva *S. aureus* (Figura 22) demonstram a inativação de 2 logaritmos para o fotossensibilizador Bchl-Cat a partir da concentração de 1  $\mu\text{M}$  e dose de luz de 20  $\text{J}/\text{cm}^2$ , e inativação maior que de 7 logaritmos para o fotossensibilizador

catiônico Bchl-Cat na concentração de 50  $\mu\text{M}$  a partir da dose de luz de 20  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Nas doses de luz acima de 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  a inativação [e significativa já ocorre na concentração de 1  $\mu\text{M}$  para o fotossensibilizador Bchl-Cat. Esses resultados são significativamente relevantes, pois quando comparados aos grupos controle,  $p < 0,05$ . Assim, as comparações entre os grupos, são estatisticamente confiáveis e não ocorrem por variações aleatórias entre os dados.

Esses resultados assemelham-se aos obtidos por HUANG et al., (2014) que obteve inativação de *S. aureus* com fotossensibilizador catiônico derivado de bacterioclorina sintética na concentração de 0,2  $\mu\text{M}$  e dose de luz de 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Inativação de *S. aureus* com fotossensibilizador bacterioclorina policatiônica sintética na concentração de 100  $\mu\text{M}$  e dose de luz de 25  $\text{J}/\text{cm}^2$ , também foi realizada por AKHLYUSTINA et al. (2019). Biofilme de *S. aureus* também foi inativado em 6 logaritmos na concentração de 250  $\mu\text{M}$  e dose de luz de 50  $\text{J}/\text{cm}^2$  por TIGANOVA; ZHIZHIMOVA; PHILIPOVA, 2020. Bacterioclorina aminada por uma molécula de spermine inativou *S. aureus* na concentração de 10  $\mu\text{M}$  e dose de luz de 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  (BALLATORE et al., 2019).

Os resultados também são positivos para o fotossensibilizador Bchl-M a partir da concentração 50  $\mu\text{M}$  já na dose de luz de 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  e inativação de 4 logaritmos para a concentração de 1 $\mu\text{M}$  na dose de luz de 45  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Esses resultados obtidos com o fotossensibilizador Bchl-M corroboram com os obtidos por RODRIGUES et al., (2024), onde observa-se inativação de 4 logaritmos para *S. aureus* na concentração de 1  $\mu\text{M}$  nas doses de luz a partir de 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  e diminuição considerável do microrganismo a partir da concentração de 15 $\mu\text{M}$  para dose de luz a partir de 20  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

Ao se observar os resultados de Bchl-M e Bchl-Cat com a mesma concentração de 1  $\mu\text{M}$  e a mesma dose de luz de 30  $\text{J}/\text{cm}^2$ , a ausência de inibição de um fotossensibilizador com a significativa inibição do outro, ressalta a importância da presença do grupamento catiônico para uma inibição mais acentuada. Assim, mesmo que os resultados de inibição de *S. aureus* com Bchl-M sejam eficazes, a inibição de *S. aureus* com Bchl-Cat é ainda melhor, pois a inibição ocorre em concentrações menores de fotossensibilizador e doses menores de luz.

BARBOZA et al., (2018) conseguiu inibir *S. aureus* em 6 logaritmos com fotossensibilizador Bacterioclorina Trisma em concentração de 25  $\mu\text{M}$  e dose de luz de 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  e inibição significativa em concentração de 25  $\mu\text{M}$  de dose de luz de 30  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Entretanto, para *S. aureus* em formação de biofilme, os resultados não ultrapassaram inibição de 1 logaritmo mesmo com uso de surfactantes não iônicos.

Outros fotossensibilizadores tem mostrado eficácia na inativação de *S. aureus*. Estudos com porfirinas demonstraram inativação de *S. aureus* (AMOS-TAUTUA, 2019). A

ftalocianina também é eficiente na fotoinativação desta bactéria gram-positiva (cepa ATCC 6538-P, FDA 209-P). Ftalocianina com adição de 0,1% de EDTA dissódico di-hidratado a cada solução de macrociclo em uma concentração de  $5 \times 10^{-4}$  mol, demonstrou uma diminuição de cinco a seis logs de unidades formadoras de colônias (UFC) (BEREZIN, 2020). Estudos também relatam a inativação de *S. aureus* com derivados da clorofila, como as clorinas Chl-e6 e Chl-e6H, em concentrações de 10 µg/mL (16 µM), em dose de luz de 30 J/cm<sup>2</sup> (ULIANA; PIRES; PRATAVIEIRA, 2014).

Em sua revisão sistemática MATHUR (2023), destaca alguns fotossensibilizadores que tem demonstrado bons resultados para bactérias do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter sp.*). Entre eles estão, azul de metileno e porfirinas com maior número de estudos, clorina e6, photofrin®, ftalocianinas, bacterioclorinas, riboflavina, photodithazine®, ALA e rosa bengala. Finalmente, Perez, Zúñiga E Palavecino, 2021 traz uma revisão de fotossensibilizadores que tem demonstrado eficácia para inativação de *S. aureus* MRSA e entre eles destacam-se as porfirinas, azul de metileno, ALA, azul de toluidina, rosa bengala, curcumina e indocianina verde.

### 5.4.3 *Escherichia coli*

O terceiro microrganismo avaliado foi *E. coli*, e, para tanto, foram utilizadas duas bacterioclorinas, Bchl-M e Bchl-Cat nas concentrações de 150, 200 e 250 µM e doses de luz de 20, 30 e 45 J/cm<sup>2</sup>.

Os resultados obtidos neste ensaio para a bactéria Gram-negativa *E. coli* nas concentrações de 150 e 200 µM e doses de luz de 20, 30 e 45 J/cm<sup>2</sup>, não demonstraram inibição do crescimento da bactéria em todas as concentrações e doses de luz para o fotossensibilizador Bchl-M. Inibição de apenas um logaritmo foi observada em concentração de 150 e 200 µM e dose de luz de 45 J/cm<sup>2</sup> de um log para Bchl-cat. Esses resultados de 150 e 200 µM estatisticamente significantes, pois quando comparados aos grupos controle, p é menor que 0,05. Assim, as comparações entre os grupos, são confiáveis e não ocorrem por variações aleatórias ao acaso entre os dados. Os valores de p foram menores que 0,05 no teste estatístico ANOVA demonstrando diferenças significativas entre os grupos. Vale salientar que nos grupos controle, a presença somente dos fotossensibilizadores e ausência de luz, não causa inativação de *E. coli*, assim como não ocorre inativação de *E. coli* na presença somente de dose de luz. Portanto, a inativação necessita de ambos os componentes, presença

de um fotossensibilizador e de doses de luz no comprimento de onda de 780 nm.

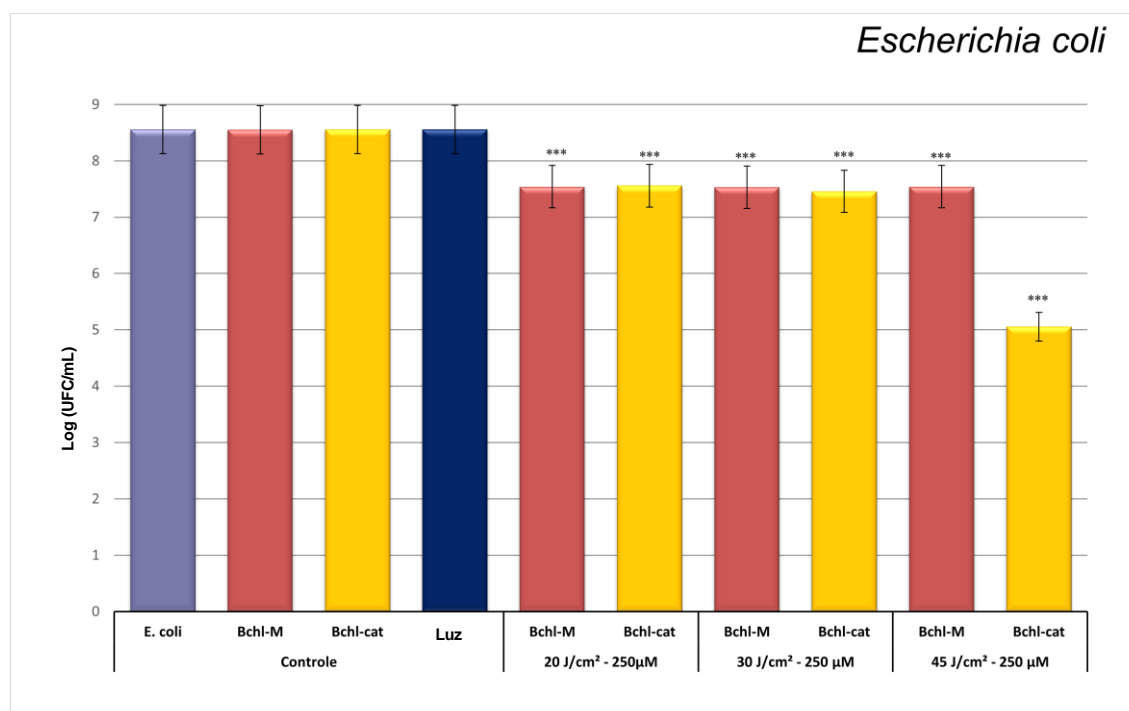


Figura 23: Fotoinativação de *E. coli* com 20, 30 e 45 J/cm<sup>2</sup> utilizando os fotossensibilizadores (PS) Bchl-M e Bchl-Cat concentração 250 µM. Controle: *E. coli* (somente microrganismo); Bchl-M e Bchl-Cat (microrganismo + PS a 250 µM, sem luz) e luz (microrganismo + luz a 45 J/cm<sup>2</sup>). Os resultados dos experimentos indicados com (\*\*\*) diferem significativamente do controle de *E. coli* ao nível de significância de  $p < 0,05$ .

Como pode ser observado na figura 23, que apresenta os resultados com a concentração de 250 µM e doses de luz de 20, 30 e 45 J/cm<sup>2</sup>, ocorreu diminuição de cerca de um logaritmo é mantida para o fotossensibilizador Bchl-M e Bchl-Cat em todas as doses de luz. Entretanto, em concentração de 250 µM e 45 J/cm<sup>2</sup>, o fotossensibilizador Bchl-Cat demonstra a inibição de cerca de 4 logaritmos, que é um resultado significativo quando comparado com os grupos controle onde  $p$  é menor que 0,05 no teste e estatístico ANOVA, e, portanto, existem diferenças significativas entre os grupos. Este ensaio pode indicar que futuros ensaios com concentrações maiores do fotossensibilizador Bchl-Cat ou quem sabe das doses de luz, pode levar a inibição de *E. coli*. Outro ponto a ser melhorado é a inserção de radicais que possam tornar a molécula com maior número de grupos catiônicos, visto que os resultados obtidos por HUANG et al., (2014), demonstram que uma bacterioclorina dicatiônica inativou *E. coli* em 6 logs com concentração de 1 µM e 2 µM e dose de luz de 10 J/cm<sup>2</sup>, e de 5 logs para *E. coli* em maiores concentrações (5 µM) de fotossensibilizador mesmo com uma bacterioclorina monocatiônica.

BALLATORE et al., (2019) conseguiu inativar *E. coli* com dose de luz de 30 J/cm<sup>2</sup> e concentração de 0,5 e 1 µM de bacterioclorina adicionada de duas moléculas de spermine. Essa adição de duas moléculas de spermine pode ter sido o diferencial ao se comparar a este ensaio pois a

Bchl-Cat, possui somente um grupo aminado catiônico adicionado.

BARBOZA et al., (2018) não conseguiu inibir *E. coli* com fotossensibilizador Bacterioclorina Trizma em concentrações de 100 e 200  $\mu\text{M}$  e doses de luz de 50 e 100  $\text{J}/\text{cm}^2$ , sugerindo que o fotossensibilizador não tenha conseguido penetrar na parede celular da bactéria Gram-negativa.

SOBOTTA et al., (2019) traz uma revisão de trabalhos com *E. coli* e com fotossensibilizadores derivado de porfirinas, clorinas e Ftalocianinas que demonstram seu alto potencial de inativação. Mas destaca que são necessárias pesquisas extensas e melhores protocolos para que a terapia fotodinâmica possa ser usada em doenças e que esse tipo de terapia é limitado a infecções superficiais, por conta da necessidade de irradiação de luz.

Outros estudos são citados por FERRISSE et al. 2022, onde *E. coli* foi inativada por outros fotossensibilizadores como Curcumina, Azul de Toluidina e Azul de metileno. A curcumina também é destacada por Law, Leung E Xu et al., 2023 como fotossensibilizador capaz de inibir *E. coli*. Além disso, MATHUR, et al. 2023, reúne trabalhos com fotossensibilizadores capazes de inativar *E. coli*: photofrin®, ftalocianina, vitamina K5, bacterioclorina, riboflavina, photodithazine®, azul de metileno e porfirina.

#### **5.4.4 *Salmonella thiphimurium***

O quarto microrganismo avaliado foi *Salmonella typhimurium*, e, para tanto, foram utilizadas duas bacterioclorinas, Bchl-M e Bchl-Cat nas concentrações de 150, 200 e 250  $\mu\text{M}$ . A fim de avaliar o efeito da dose de luz, foram utilizadas doses de 20, 30 e 45  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

Inicialmente, podemos observar na figura 24, que os grupos controle, onde há apenas a presença do microrganismo e dos fotossensibilizadores e ausência da luz, não ocorre inativação de *Salmonella*, demonstrando que o fotossensibilizador não é tóxico no escuro. Da mesma forma, como não ocorre inativação de *Salmonella* somente na presença de luz. Portanto, a inativação necessita da luz e do fotossensibilizador para ser efetiva.

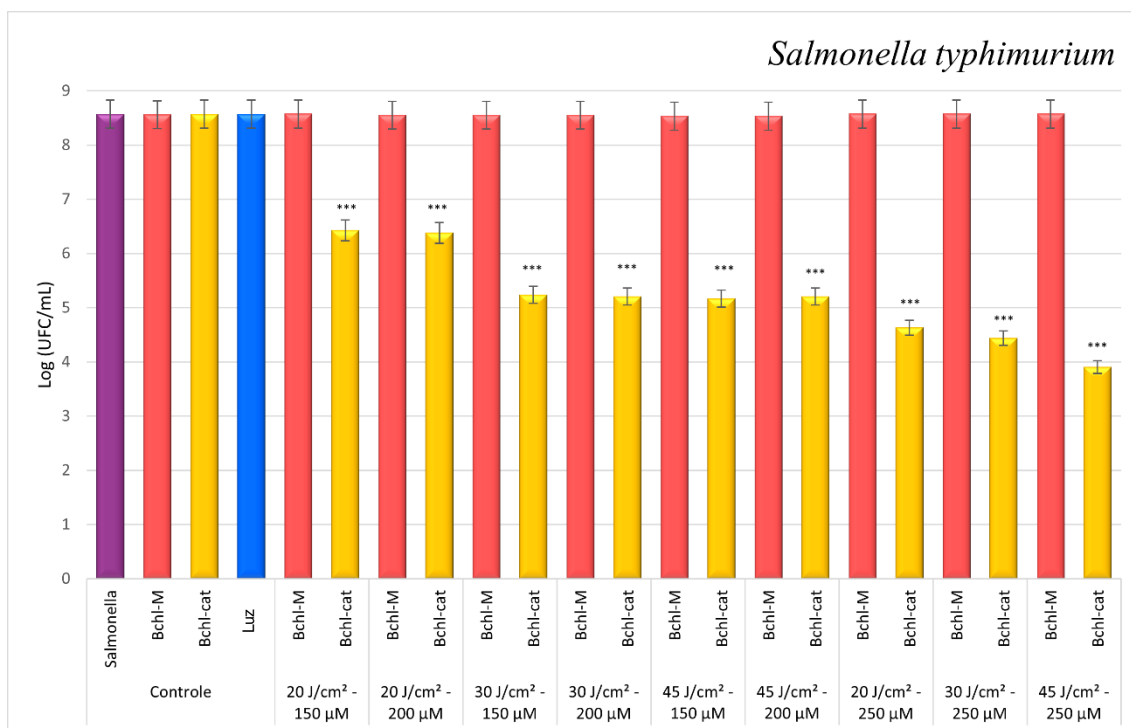


Figura 24: Fotoinativação de *Salmonella typhimurium* com 20, 30 e 45 J/cm<sup>2</sup> usando os fotossensibilizadores (PS) Bchl-M e Bchl-Cat em diferentes concentrações 150, 200 e 250 μM. Controle: *Salmonella typhimurium* (somente microrganismo); Bchl-M e Bchl-Cat (microrganismo + PS a 200 μM, sem luz) e luz (microrganismo + luz a 45 J/cm<sup>2</sup>). Os resultados dos experimentos indicados com (\*\*\*) diferem significativamente do controle de *Salmonella typhimurium* em nível de significância de p < 0,05.

No ensaio de fotoinativação realizado com *Salmonella*, utilizando concentrações do fotossensibilizador Bchl-Cat de 150 e 200 μM e doses de luz de 20, 30 e 45 J/cm<sup>2</sup>, foi observada uma redução de 2 logaritmos nas concentrações de 150 e 200 μM do fotossensibilizador Bchl-Cat e dose de luz de 20 J/cm<sup>2</sup>. Além disso, reduções de 3 logaritmos foram constatadas nas mesmas concentrações de 150 e 200 μM do fotossensibilizador Bchl-Cat em doses de luz de 20, 30 e 45 J/cm<sup>2</sup>.

Na concentração de 250 μM Bchl-Cat inibe cerca de 5 logaritmos a partir da dose de luz de 20 J/cm<sup>2</sup> e mantêm-se nas demais doses de luz. O valor de p nestes grupos foi menor que 0,05 no teste estatístico ANOVA, demonstrando que existem diferenças significativas. Para Bchl-M não ocorreu inibição em nenhuma concentração ou dose de luz. Este ensaio é promissor e pode indicar que aumentando-se as concentrações do fotossensibilizador Bchl-Cat ou quem sabe as doses de luz, a inibição de *Salmonella* poderá ocorrer, visto que a inativação é dependente da concentração do fotossensibilizador e das doses de luz. Aumentando-se a dose de luz a concentração do fotossensibilizador pode ser diminuída, o que pode ser mais interessante do que aumentar a concentração do fotossensibilizador, visto que a obtenção do fotossensibilizador e as possíveis modificações estruturais são as etapas mais demoradas e que tem mais custo do estudo. Outro ponto

a ser melhorado é a inserção de radicais que possam tornar a molécula com mais pontos catiônicos, visto que o fotossensibilizador Bchl-Cat possui somente uma amina catiônica.

GONÇALVES et al., (2020), conseguiu inativar *Salmonella typhimurium* por uma porfirina tetra catiônica complexada com Zn (II) e outra porfirina tetracatiônica complexada com Ru (II)-bipiridil. Em concentração de 25  $\mu\text{M}$  com lâmpada halógena com valores de fluência de 0, 180, 360, 720 e 1080  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

Outros fotossensibilizadores também foram capazes de inativar *Salmonella*, como a curcumina em concentração de 75 mM e dose de luz de 417 $\text{J}/\text{m}^2$  (PENHA, et al., 2017), a curcumina que foi capaz de diminuir de 1 a 3 logs de crescimento de *Salmonella* isolada de frangos (GAO, et al., 2023).

#### 5.4.5 *Candida albicans*

O quinto microrganismo avaliado foi *Candida albicans*, e, para tanto, foram utilizadas duas bacterioclorinas, Bchl-M e Bchl-Cat nas concentrações de 50, 100 e 250  $\mu\text{M}$ . A fim de avaliar o efeito da dose de luz, foram utilizadas doses de 20, 30 e 45  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

*C. albicans* é normalmente encontrado nas cavidades orais de humanos, mas pode causar candidíase em indivíduos imunocomprometidos e pode ser resistente a medicamentos (DIAS, 2020b). O ensaio feito com *C. albicans*, primeiramente utilizou fotossensibilizadores Bchl-M e Bchl-Cat nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$  e nas doses de luz de 20  $\text{J}/\text{cm}^2$ , 30  $\text{J}/\text{cm}^2$  e 45  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Os resultados deste ensaio demonstraram cerca de 3 logaritmos de inibição somente para o fotossensibilizador Bchl-Cat na concentração de 100  $\mu\text{M}$  e dose de luz de 45  $\text{J}/\text{cm}^2$ . O fotossensibilizador Bchl-M demonstrou inibição de cerca de somente 1 log de *Candida albicans* para todas as concentrações ou doses de luz. Esses resultados apresentaram alta significância quando comparados aos grupos controle, com valores de p menores que 0,05 no teste estatístico ANOVA, e, portanto, sugerem que a hipótese nula é rejeitada e, assim, existem diferenças significativas entre os grupos.

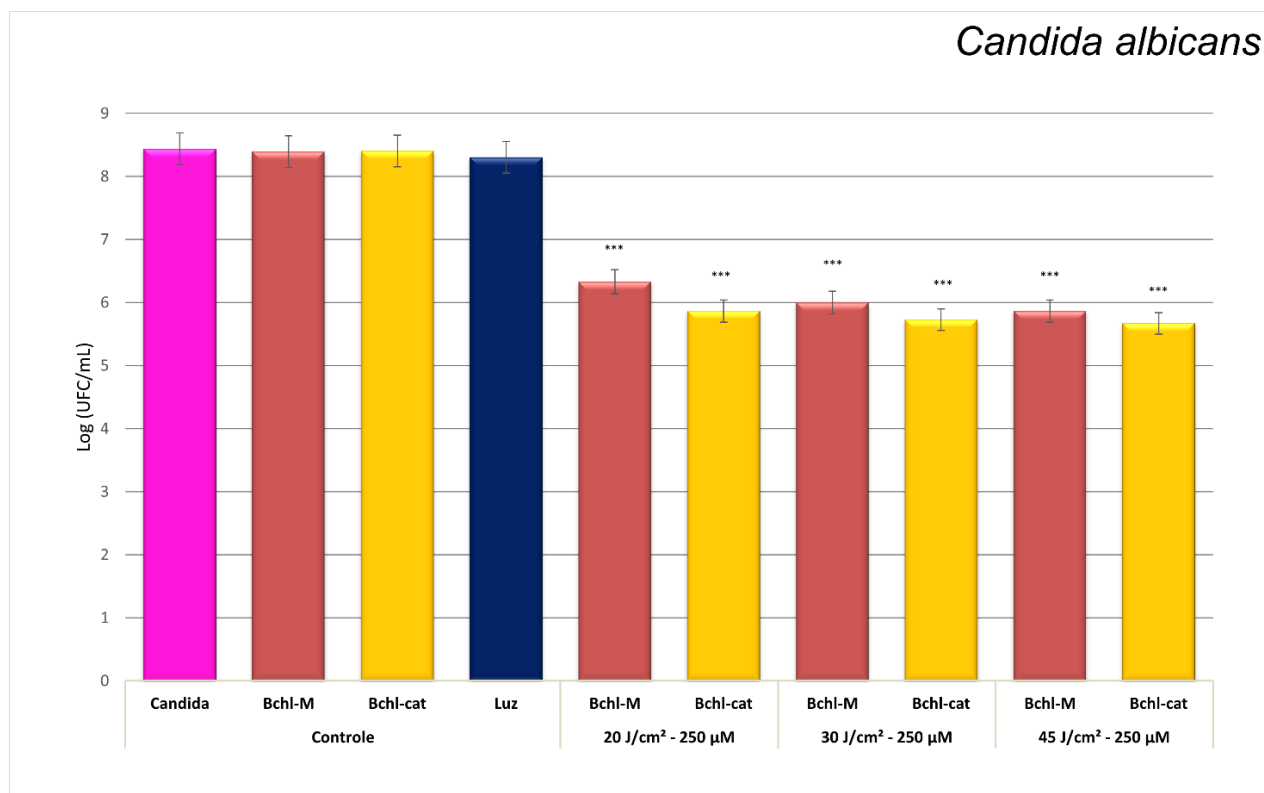


Figura 25: Fotoinativação de *Candida albicans* com 20, 30 e 45 J/cm<sup>2</sup> utilizando os fotossensibilizadores (PS) Bchl-M e Bchl-Cat nas concentrações de 250 µM. Controle: *Candida albicans* (somente microrganismo); Bchl-M e Bchl-Cat (microrganismo + PS a 250 µM, sem luz) e luz (microrganismo + luz a 45 J/cm<sup>2</sup>). Os resultados dos experimentos indicados com (\*\*\*) doses de luz a 20, 30 e 45 J/cm<sup>2</sup> e concentração de 250 µM para Bchl-Cat e Bchl-M, diferem significativamente do controle *Candida albicans* a um nível de significância de  $p < 0,05$ .

Nos grupos controles (Figura 25), onde há apenas a presença do microrganismo e dos fotossensibilizadores e ausência da luz, não ocorre inativação de *C. albicans*. No grupo controle onde há apenas o microrganismo e a dose de luz, também não ocorre inativação de *C. albicans*, dessa forma, é importante destacar que a inativação necessita de ambos os componentes, presença de um fotossensibilizador e de luz.

A figura 25 apresenta o ensaio feito com *Candida albicans* e os fotossensibilizadores Bchl-cat e Bchl-M na concentração de 250 µM e doses de luz de 20, 30 e 45 J/cm<sup>2</sup>. Observou-se uma diminuição de cerca de 2 a 3 logaritmos de ambos fotossensibilizadores em todas as concentrações e doses de luz. A inibição observada para o fotossensibilizador Bchl-Cat não foi diferente do observado na concentração de 100 µM na dose de luz de 45 J/cm<sup>2</sup>, e, portanto, outros ensaios com maiores concentrações foram descartados. O fotossensibilizador Bchl-M também demonstrou inibição de cerca de 2 a 3 logs em todas as concentrações e doses de luz. Esses resultados apresentaram alta significância quando comparados aos grupos controle, valores de  $p$  foram menores que 0,05 no teste estatístico ANOVA, e, portanto, sugerem a existência de diferenças significativas entre os grupos.

HUANG et al., (2014) conseguiu inibição de 6 logs de *Candida albicans* com uma bacterioclorina monocatiônica na concentração de 1  $\mu\text{M}$  e dose de luz de 30  $\text{J}/\text{cm}^2$ . MARTINS, et al., (2019) utilizou uma bacterioclorina Trisma em seu ensaio com e não obteve bons resultados mesmo aumentando concentração do fotossensibilizador, onde testou até uma concentração de 20  $\mu\text{M}$ , ou de dose de luz, onde testou até 75  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Muito pelo contrário, observou-se que uma menor concentração de fotossensibilizador (1  $\mu\text{M}$ ) foi mais eficaz na inibição de *Candida albicans* e isto pode ter ocorrido por uma menor taxa de precipitação de bacterioclorina Trisma.

BALLATORE et al., (2019) conseguiu inativar *Candida albicans* com dose de luz de 30  $\text{J}/\text{cm}^2$  e concentração de 1  $\mu\text{M}$  de bacterioclorina policatiônica adicionada de duas moléculas de spermine.

Outros fotossensibilizadores também foram utilizados na inativação de *C. albicans*. A curcumina tem sido utilizada como fotossensibilizador e a eficácia contra *Candida spp.* plantônica in vitro foi alcançada com 20  $\mu\text{M}$  5,28  $\text{J}/\text{cm}^2$  (SANTEZI; REINA; DOVIGO, 2018). Em biofilmes de *C. albicans*, a curcumina alcançou uma redução de 85% foi alcançada com 40  $\mu\text{M}$  e 18  $\text{J}/\text{cm}^2$  (DOVIGO, 2013). Uma revisão de literatura feita por DIAS et al., 2020a, traz diversos estudos utilizando a curcumina como fotossensibilizador com efeitos significativos na inativação de *C. albicans* e outras espécies do gênero *Candida*. O CHL-E6H (clorofila e6) inibiu esses microrganismos nas concentrações de 20 e 30  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  utilizando 30 e 60  $\text{J}/\text{cm}^2$ . (ULIANA; PIRES; PRATAVIEIRA, 2014). Estudos com *C. albicans* também mostraram que fotossensibilizadores como porfirinas, azul de toluidina, azul de metileno são eficazes na inativação de *C. albicans* em estudos in vitro (MA et al., 2020; MALISZEWSKA; WANARSKA; TYLUS, 2020; HUTNICK et al., 2017).

Finalmente, RODRÍGUEZ-CERDEIRA et al., 2021 lista 84 estudos utilizando cianinas (Ftalocianina), clorinas (Chlorin e6 e Photoditazine®), porfirinas (Hematoporfirina e ALA), clorofilas (Feoforbide A), corantes naturais (Riboflavina) e corantes sintéticos (Azul de metileno, azul de toluidina, rosa bengala, cristal violeta e verde malaquita), com resultados significativos para a inativação de *C. albicans* e *Candida spp.*

#### **5.4.6 BACTÉRIA ISOLADA DA AMOSTRA DE CHORUME, *Serratia sp.***

O teste de inativação feito com *Serratia sp.* foi realizado no intuito de testar se o pigmento encontrado, com absorção em 750 nm, era capaz de inativar a própria bactéria na presença de doses de luz. Portanto, os testes foram feitos em doses de luz de 20, 30 e 45 e grupo controle de ausência de luz. Pois, visto que como o resultado da análise genética do microrganismo CH1 isolado

de chorume, resultou em um microrganismo que pode ser patógeno para o ser humano, não pareceu interessante cultivar em grandes quantidades para produção de moléculas fotossensibilizadoras. Foi realizado somente um ensaio para verificação de fotoinativação do próprio microrganismo na presença da dose de luz no comprimento de onda desejado.

Neste ensaio não ocorreu inativação da própria bactéria *Serratia* sp. Ou seja, apenas a concentração de moléculas presentes na própria célula bacteriana na presença de doses de luz, não é suficiente para fotoinativação. Alguns autores têm estudado o pigmento prodigiosina extraído de *Serratia* sp. e *Serratia marcescens* e obtido resultados interessantes de inativação fotodinâmica com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como discutido na seção de isolamento de microrganismos, entre os microrganismos inativados *S. aureus*, MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina), *P. aeruginosa*, *E. coli*, e biofilme de *Staphylococcus epidermidis* foram inativados por prodigiosina (JI; JEONG; KIM, 2015; AMIM et al., 2022; JARDAK et al., 2022). As bactérias do gênero *Serratia* foram isoladas de sedimentos de ambientes lagos, mares, amostras de solos contaminados com pesticidas e de plantações de grãos (HAN et al., 2021).

Neste estudo, foi produzida uma molécula fotossensibilizadora capaz de inativar, ou com potencial de inativar, microrganismos de interesse clínico. A busca por novas fontes de fotossensibilizador na faixa de absorção de 750 nm, apesar de não ter sido positiva, proporcionou diversas possibilidades de estudos futuros que demandam mais técnicas de isolamento, bem como de modificações estruturais nas moléculas obtidas e por fim, a utilização em testes de fotoinativação de microrganismos de interesse.

As modificações estruturais para tornar a molécula mais catiônica realizadas neste estudo tornaram a bacterioclorina Bchl-Cat, mais eficiente na inativação do microrganismo Gram-positivo, *Staphylococcus aureus*. Para os microrganismos Gram-negativos, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* e para a levedura *Candida albicans*, os resultados obtidos são promissores e para futuros estudos o aumento das concentrações do fotossensibilizador e/ou das doses de luz, bem como da inserção de mais cargas catiônicas podem ser avaliados. A bactéria isolada de chorume *Serratia* sp., demonstrou potencial para ser fonte de fotossensibilizador e estudos mais específicos, com testes em temperaturas mais baixas, por exemplo, podem ser feitos para isolamento de bactérias oriundas da Antártica, bem como para o isolamento de bactérias oriundas do Lago de Itaipu.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por novas fontes naturais de fotossensibilizador na faixa de absorção de 750 nm, que corresponde ao comprimento de onda infravermelho, apesar de não ter sido positiva, proporcionou diversas possibilidades de estudos futuros que demandam mais técnicas de isolamento, bem como de modificações estruturais nas moléculas obtidas e por fim, a utilização em testes de fotoinativação de microrganismos. Dessa forma, mesmo que as moléculas não tenham sido oriundas das amostras isoladas de sedimentos de ambientes de chorume, do fundo do lago de Itaipu e do ambiente Antártico, podemos dizer que os objetivos foram alcançados e que os resultados foram capazes de responder aos questionamentos que deram origem à pesquisa.

Este estudo possibilitou a produção de uma molécula fotossensibilizadora, Bchl-Cat, a partir de uma bacterioclorina extraída de *R. faecalis*, capaz de inativar, ou com potencial de inativar, microrganismos de interesse clínico. A bactéria Gram-positiva *S. aureus* foi inativada pelo fotossensibilizador caracterizado e modificado estruturalmente, Bchl-Cat, e as bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa*, *Salmonella* e *E. coli*, tiveram bons resultados de inibição com Bchl-Cat. A levedura *Candida albicans*, também apresentou resultados de inibição significativos, com Bchl-Cat e, também com Bchl-M. Vale destacar a importância clínica e econômica de uma molécula como Bchl-Cat, capaz de inativar um amplo espectro de microrganismos. Além disso, Bchl-Cat é uma molécula natural, inédita, extraída de bactéria púrpura não sulfurosa, tornando os resultados deste estudo importantes do ponto de vista da sustentabilidade para o desenvolvimento em pesquisas na área da saúde, o que o torna importante no campo de pesquisa da inativação fotodinâmica no Brasil.

Estudos posteriores poderão ser realizados com *Serratia* sp. e seu pigmento com comprimento de onda na faixa de 750 nm, inclusive com modificações estruturais na molécula, para testes de inativação com microrganismos. Além disso, as amostras do ambiente Antártico poderão ser mais exploradas, já que demonstraram em outros estudos, enorme potencial biotecnológico e, os testes realizados neste estudo, podem não ter sido eficientes no isolamento das possíveis bactérias púrpuras não sulfurosas.

Finalmente, em estudos posteriores, poderão ser inseridos mais grupamentos catiônicos na bacterioclorina isolada de *R. faecalis*, ou de outras moléculas oriundas de outros microrganismos, para que sua eficiência na inativação de microrganismos Gram-negativos e leveduras, seja de fato significativa e promissora para o tratamento das infecções causadas por microrganismos patogênicos.

## REFERÊNCIAS

AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic Therapy of cancer: An update. **American Cancer Society**, v. 61, p. 250–281, 2011.

AKHLYUSTINA, E. V. et al. New cationic photosensitizers: Photophysical properties and results of preliminary studies of antibacterial efficacy. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1189, n. 1, 2019.

AKHLYUSTINA, E. V. et al. Study of new infrared photosensitizers for photodynamic inactivation of pathogenic bacteria based on synthetic bacteriochlorin derivatives. **Proceedings - International Conference Laser Optics**, p. 594, 2018.

ALEM, D. et al. Production and antiproliferative effect of violacein, a purple pigment produced by an Antarctic bacterial isolate **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 36:120, 2020.

AMOS-TAUTUA, B.M. et al. Molecules application of porphyrins in antibacterial photodynamic therapy. **Molecules**, 24:132456, 2019.

ANJU, V. T., et al. Antimicrobial photodynamic activity of toluidine blue-carbon nanotube conjugate against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* - Understanding the mechanism of action. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 27, 305–316, 2019.

AROSO, R. T. et al. Photoinactivation of microorganisms with sub-micromolar concentrations of imidazolium metallophthalocyanine salts. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 184, 2019.

ATIF, M. et al. In vitro studies of Photofrin® mediated photodynamic therapy on human rhabdomyosarcoma cell line (RD). **Laser Physics**, 22(1), 286–293, 2012.

BAG, S. et al. Molecular Insights into Antimicrobial Resistance Traits of Commensal Human Gut Microbiota. **Microbial Ecology**, 77(2), 546–557, 2019.

BAGNATO, V. S. INTRODUÇÃO. In: BAGNATO, V. S. et al. **Controle microbiológico com ação fotodinâmica**. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2017. p. 11-20.

BAGNATO, V. S.; REQUENA, M. B. **Terapia fotodinâmica**. São Carlos: Even3 Publicações Editora, 312 p., 2023.

BAKER, J. M. et al. GenomeSequence of *Rhodospirillum rubrum* ANT.BRT; A Psychrophilic Purple Nonsulfur Bacterium from an Antarctic. **Microbial Mat Microorganisms**, 5, 8, 2017.

BALLATORE, M. B. et al. Bacteriochlorin-bis(spermine) conjugate affords an effective photodynamic action to eradicate microorganisms. **Journal of Biophotonics**, v. 13, n. 2, p. 1–12, 2020.

BARBOZA, D. et al. Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* using a new bacteriochlorin as photosensitizer. **Proc. SPIE 10476, Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXVII, 104760X** n. February 2018, p. 32, 2018.

BEREZIN, D.B., et al. Aggregation of water soluble octaanionic phthalocyanines and their photoinactivation antimicrobial effect in vitro. **Mendeleev Commun** 30(5):621–623, 2020.

BERGER-BÄCHI, B.; ROHRER, S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. **Arch Microbiol** 178, 165–171, 2002.

BONGOMIN, F.; et al. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. **Journal of Fungi**, v. 3, 2017.

CARLOS, L. M. et al. Bioprospecting the potential of the microbial community associated to Antarctic marine sediments for hydrocarbon bioremediation. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2023.

CENTURION, V.B. et al. Microbiome structure in biofilms from a volcanic island in Maritime Antarctica investigated by genome-centric metagenomics and metatranscriptomics. **Microbiological Research** 265, 127197, 2022.

CHEN, C. Y.; BOCIAN, D. F.; LINDSEY, J.S. Synthesis of 24 Bacteriochlorin Isotopologues,

Each Containing a Symmetrical Pair of 13Co15N Atoms in the Inner Core of the Macrocyclic. **J. Org. Chem.** 79, 1001–1016, 2014.

CHEN, H.; DAI, Z. Antitumor immune responses induced by photodynamic and sonodynamic therapy: a narrative review. **Journal of Bio-X Research**, 4(2), 77–86., 2021.

CHEN, Y.; LI, G.; PANDEY, R. Synthesis of Bacteriochlorins and Their Potential Utility in Photodynamic Therapy (PDT). **Current Organic Chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1105–1134, 2015.

CHOWN, S. L. et al. The changing form of Antarctic biodiversity. **Nature**, 522(7557), 431–438, 2015.

CUI, D. et al. A Semiconducting Polymer Nano-prodrug for Hypoxia-Activated Photodynamic Cancer Therapy. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 58, n. 18, p. 5920–5924, 2019.

DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic Therapy Targeted to Pathogens. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**. 2004, 17, 245, 2004.

DIAS L.M., et al. Successive applications of Antimicrobial Photo dynamic Therapy effects the susceptibility of *Candida albicans* grown in medium with or without fluconazole. **Photodiagn Photodyn Ther** 32:102018, 2020b.

DIAS, L.D.; et al. Curcumin as a photosensitizer: From molecular structure to recent advances in antimicrobial photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.** 2020, 45, 100384, 2020a.

DLUGASZEWSKA, J. et al. Antimicrobial and anticancer photodynamic activity of a phthalocyanine photosensitizer with N-methyl morpholiniummethoxy substituents in non-peripheral positions, **Journal of Inorganic Biochemistry**, Volume 172, 67-79, 2017.

DOVIGO, L.N. et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. **Med Mycol** 51(3):243–251, 2013.

DUDKIN, S. V. et al. 2013 RU Patent 2476218

DUDKIN, S. V. et al. 2013 RU Patent 2479585

ELAHI, Y.; BAKER, M.A.B. Light Control in Microbial Systems. **Int. J. Mol. Sci.**, 25, 4001, 2024.

FEIJÓO-VIVAS, K.; et al. Bioproductos desarrollados a partir de micelio de hongos: Una nueva cultura material y su impacto en la transición hacia una economía sostenible. **Revista Bionatura**, v. 6, p. 01-29, 2021.

FENG, W. et al. Highly oxygenated meroterpenoids from the Antarctic fungus *Aspergillus terreus*. **Phytochemistry**, 164, 184–191, 2019.

FERRISSE, T. M., et al. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy mediated by photosensitizers conjugated with inorganic nanoparticles: Systematic review and meta-analysis. **Pharmaceutics**, 14, 2050, 2020

GAO, J., et al. Influences of photosensitizer curcumin on microbial survival and physicochemical properties of chicken during storage. **Poultry Science**, 102(2), 2023.

GARBO, G. M. et al. Differential vascular response and relationship to tumor response with photodynamic therapy using WST-09 (TOOKAD). **Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XIII**, v. 5315, n. June 2004, p. 18, 2004.

GARLAND, M. J. et al. Designing photosensitizers for photodynamic therapy: Strategies, challenges and promising developments. **Future Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 667–691, 2009.

GONÇALVES, P. J.; et al. Photoinactivation of *Salmonella enterica* (serovar Typhimurium) by tetra-cationic porphyrins containing peripheral [Ru(bpy)<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup> units. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Volume 391, 2020.

HAMBLIN, M. R.; JORI, G. Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens Medical and Environmental Applications: light strikes back microorganisms in the new millennium. **Photochemistry And Photobiology**, [s. l], v. 87, p. 1479-1479, 21 nov. 2011.

HAMBLIN, M.R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes, **Curr. Opin. Microbiol.** 33, 67-73, 2016

HAN, R. et al. High-level production of microbial prodigiosin: A review **J Basic Microbiol**, 61:506–523, 2021.

HUANG, J. P. et al. Antimicrobial activity of PVP from an Antarctic bacterium, *Janthinobacterium sp.* Ant5-2, on multi-drug and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* **Nat. Prod. Bioprospect.** 2, 104–110, 2012.

HUANG, L. et al. Stable synthetic cationic bacteriochlorins as selective antimicrobial photosensitizers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 9, p. 3834–3841, 2010.

HUANG, L. et al. Stable synthetic mono-substituted cationic bacteriochlorins mediate selective broad-spectrum photoinactivation of drug-resistant pathogens at nanomolar concentrations. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 141, p. 119–127, 2014.

Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. **Agenda 2030: objetivos de desenvolvimento sustentável: avaliação do progresso das principais metas globais para o Brasil: ODS 3: assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todas e todos, em todas as idades.** Brasília: Ipea, 2024. 22 p. (Cadernos ODS, 3). DOI: <http://dx.doi.org/10.38116/ri2024ODS3>.

JARDAK, M. et al. Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic properties of prodigiosin produced by a newly isolated *Serratia sp.* C6LB from a milk collection center. **Microbial Pathogenesis**, 164, 105449, 2022.

JI, K.; JEONG, T. H.; KIM, Y. T. Anti-MRSA Properties of Prodigiosin from *Serratia sp.* PDGS 120915. **Journal of Life Science**, Vol. 25. No. 1. 29~36, 2015

JIMTHA, C. J. Antifungal properties of prodigiosin producing rhizospheric *Serratia sp.* **Rhizosphere**, 3, 105-108, 2017.

JUNG, D. O. et al. A gas vesiculate planktonic strain of the purple non-sulfur bacterium *Rhodoferrax antarcticus* isolated from Lake Fryxell, Dry Valleys, Antarctica. **Arch Microbiol** 182:236–243, 2004.

KARR, E.A. et al. Remarkable Diversity of Phototrophic Purple Bacteria in a Permanently Frozen Antarctic Lake **Applied and environmental microbiology**, Aug. 2003, p. 4910–4914 Vol. 69, No. 8, 2003.

KASSEM, A., et al. Applications of Fourier Transform-Infrared spectroscopy in microbial cell biology and environmental microbiology: advances, challenges, and future perspectives. **Front. Microbiol.** 14:1304081, 2023.

KENNEDY, J. et al. Functional metafenomic strategies for the discovery of novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications form marine ecosystems. **J. Appl. Microbiol.** 111:787-799, 2011.

KIM, H. J.; LINDSEY, J.S De novo synthesis of stable tetrahydroporphyrinicmacrocycles: bacteriochlorins and a tetrahydrocorrin, **J. Org. Chem.** 70, 5475-5486, 2005

LARIO, L. D. et al. Production, purification, and characterization of an extracellular acid protease from the marine Antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. **Fungal Biology**, 119(11), 1129–1136, 2015.

LASSALLE, H. P. et al. Mass spectrometric analysis for the characterization of the 5,10,15,20-tetrakis-(m-hydroxyphenyl) bacteriochlorin (m-THPBC) photoproducts in biological environment. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, n. 9, p. 1149–1156, 2005.

LAW, S. K.; LEUNG, A. W. N.; XU, C. Photodynamic action of curcumin and methylene blue against bacteria and SARS-CoV-2—A review. **Pharmaceuticals**, 17, 34, 2023

LAZIC, J. et al. Synthesis, Anticancer Potential and Comprehensive Toxicity Studies of Novel Brominated Derivatives of Bacterial Biopigment Prodigiosin from *Serratia marcescens* ATCC 27117. **Molecules**, 27, 3729, 2022.

LOPES, N.S.S. Avaliação fotodinâmica em células tumorais do câncer de mama e Fibroblasto utilizando o fotossensibilizador Bacterioclorina – Trisma. Dissertação Apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP: 2018.

MA, W. et al. The effects of aloe emodin-mediated antimicrobial photodynamic therapy on drug-sensitive and resistant *Candida albicans*. **Photochem. Photobiol. Sci.**, 19, 485–494, 2020.

MADIGAN, M.T. et al. *Rhodoferrax antarcticus* sp. nov., a moderately psychrophilic purple nonsulfur bacterium isolated from an Antarctic microbial mat. **Arch Microbiol** 173:269–277, 2000.

MADIGAN, M.T., JUNG, D.O., 2009. An Overview of Purple Bacteria: Systematics, Physiology, and Habitats. In: Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnauer, M.C., Beatty, J.T. (Eds.), *The Purple Phototrophic Bacteria, Advances in Photosynthesis and Respiration*. **Springer Netherlands, Dordrecht**, pp. 1–15, 2009.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M. E PARKER, J. *Microbiologia de Brock* 10 edição, **Prentice Hall**, 2004.

MALISZEWSKA, I.; WANARSKA, E.; TYLUS, W. Sulfonated hydroxyaluminum phthalocyanine-biogenic Au/Ag alloy nanoparticles mixtures for effective photo-eradication of *Candida albicans*. **Photodiagn. Photodyn. Ther.** 2020, 32, 102016.

MANOEL, C. A.; PAOLILLO, F. R.; DE MENEZES, P. F. C. **Conceitos fundamentais e práticos de fotoestética**. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2014.

MARTINS, L. C. et al. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* using a synthesized bacteriochlorin as a photosensitizer. **Proc. SPIE 10476, Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXVII, 104760X**, p. 284, 2019.

MATHUR, A., et al. Photodynamic therapy for ESKAPE pathogens: An emerging approach to combat antimicrobial resistance (AMR). **Microbial Pathogenesis**, 183, 106307, 2023.

MEEROVICH, G. A. et al. Novel polycationic photosensitizers for antibacterial photodynamic therapy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1282, p. 1–19, 2020.

MEEROVICH, G. A. et al. Photodynamic Inactivation of Microorganisms: Mechanisms and Applications. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 162, 123-134, 2016.

MEEROVICH, G. A. et al. Photodynamic inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* bacterial biofilms using new polycationic photosensitizers. **Laser Physics Letters**, v. 16, n. 11, 2019.

MEEROVICH, G. A. et al. Photosensitizers for antibacterial photodynamic therapy based on tetracationic derivatives of synthetic bacteriochlorins. **Laser Physics Letters**, v. 15, n. 11, 2018.

MESQUITA, M.Q. et al. Photodynamic inactivation of bioluminescent *Escherichia coli* by neutral and cationic pyrrolidine-fused chlorins and isobacteriochlorins, **Bioorg. Med. Chem. Lett** 24, (2014).

MIRONOV, A. F. Synthesis and properties of new chlorin and bacteriochlorin photosensitizers. **Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology**, 86, 1 17571, 2625, 1989.

MOAN, J.; PENG, Q. An outline of the hundred-year history of PDT. **Anticancer Research**, [S. I.], v. 23, n. 5, p. 591-600, out. 2003

MOJIB, N. et al. Antimycobacterial activity in vitro of pigments isolated from Antarctic bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek** 98:531–540, 2010.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens**, Fifth Edition, 481–511. 2016.

NALVOTHULA, R. et al. Isolation, Molecular Identification and Amino Acid Profiling of Single-Cell-Protein-Producing Phototrophic Bacteria Isolated from Oil-Contaminated Soil Samples. **Molecules**, 27(19), 2022.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 3086257, Photofrin II. Retrieved September 25, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Photofrin-II>.

NICHIPOROVICH, I. N. et al. Bacteriochlorin e6 as a sensitizer for photodynamic therapy. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 71, n. 6, p. 814–817, 2004.

NIE, H. et al. Prodigiosin derived from chromium-resistant *Serratia sp.* prevents inflammation and modulates gut microbiota homeostasis in DSS-induced colitis mice **International Immunopharmacology** 116, 109800, 2023.

O'NEILL J. **Tackling drug-resistant infections globally**; 2016.

O'NEILL, J. et al. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. **Rev. Antimicrob. Resistance** 20, 1–16, 2014

ODA, Y. et al. Genotypic and Phenotypic Diversity within Species of Purple Nonsulfur Bacteria Isolated from Aquatic Sediments **Applied and Environmental Microbiology**, p. 3467–3477 Vol. 68, 2002.

OLIVEIRA, K. T. et al. Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em terapias fotônicas. **Revista Virtual de Química**, São Carlos, v. 7, n. 1, p. 310-335, fev. 2015. Disponível em: <http://rvq.sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/937>. Acesso em: 30 setembro, 2024.

ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. Dye sensitizers for photodynamic therapy. **Materials**, v.6, p.817–840, 2013.

PENHA, C. B., et al. Photodynamic inactivation of foodborne and food spoilage bacteria by curcumin. **LWT - Food Science and Technology**, 76(B), 34-38, 2017.

PEREZ, C.; ZÚÑIGA, T.; PALAVECINO, C.E. Photodynamic therapy for treatment of *Staphylococcus aureus* infections, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, V 34, 2021.

PFALLER, M. A.; et al. Results from the artemis disk global antifungal surveillance study, 1997-2007: A 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole

as determined by CLSI standardized disk. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 1366-1377, 2010.

PLANAS, O., et al. Synthesis, photophysical characterization, and photoinduced antibacterial activity of methylene blue-loaded amino- and mannose-targeted mesoporous silica nanoparticles. **Molecules**, 20(4), 6284–6298, 2015

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.

PUCELIK, B. et al. Properties of Halogenated and Sulfonated Porphyrins Relevant for the Selection of Photosensitizers in Anticancer and Antimicrobial Therapies. **PLoS One**, 12 (10), 1–22, 2017.

PUCELIK, B.; SULEK, A.; DAŁBROWSKI, J. M. Bacteriochlorins and their metal complexes as NIT-absorbing photosensitizers: properties, mechanisms, and applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 416, 2020.

PULINGAM, T. et al. Synergistic antibacterial actions of graphene oxide and antibiotics towards bacteria and the toxicological effects of graphene oxide on human epidermal keratinocytes. **Eur. J. Pharm. Sci.** 142, 105087, 2022.

RAY, M. K. et al. Extracellular protease from the antarctic yeast *Candida humicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, 58(6), 1918–1923, 1992.

RODRIGUES, A. C. Utilização de derivados de produtos naturais porfirinóides na inativação de microrganismos usando terapia fotodinâmica. Dissertação Apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM ENERGIA E SUSTENTABILIDADE do Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade da Universidade Federal da Integração Latino Americana. Foz do Iguaçu, PR: 2022.

RODRIGUES, A. C., et al. Photoinactivation of microorganisms using bacteriochlorins as photosensitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**. 20. 2024

RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C. et al. New Applications of Photodynamic Therapy in the Management of Candidiasis. **Journal of Fungi**. 7(12):1025, 2021.

RUZIE, C. et al. Tailoring a bacteriochlorin building block with cationic, amphipathic, or lipophilic substituents, **J. Org. Chem.** 73, 5806-5820, 2009.

SANTEZI C., REINA, B.D., DOVIGO, L.N. Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections—a review. **Photodiagn Photodyn Ther** 21:409–415., 2018

SCHASTAK, S. et al. Efficient photodynamic therapy against gram-positive and gram-negative bacteria using THPTS, a cationic photosensitizer excited by infrared wavelength, **PLoS One** 5, 11674, 2010.

SCHASTAK, S. et al. Improved photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive methicillin-resistant bacterial strains using a new near-infrared absorbing meso-tetrahydroporphyrin: a comparative study with a chlorine e6 photosensitizer “Photolon,” **Methods Find, Exp. Clin. Pharmacol.** 30, 129, 2008.

SEYED-JAVADI LIMOODI, S. F.; et al. Effectiveness of photodynamic therapy with curcumin against *Candida* species: A systematic review. **International Journal of Applied Dental Sciences**. v. 7, n. 3, p. 462-469, 2021.

SHARMA, P.D. Environmental Microbiology. Alpha Science International Lda. **Harrow UK**, 2005.

SHARMA, S. et al. Drug Discovery of Antimicrobial Photosensitizers Using Animal Models. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 13, p. 1303–1319, 2012.

SHARMA, S. K. et al. Synthesis and evaluation of cationic bacteriochlorin amphiphiles with effective in vitro photodynamic activity against cancer cells at low nanomolar concentration. **Journal Of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 17, n. 0102, p. 73-85, jan. 2013.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The bacterial cell envelope. In **Cold Spring Harbor perspectives in biology** (Vol. 2, Issue 5), 2010.

SILVA, T. R. Prospecção de antibióticos e pigmentos a partir de bactérias isoladas da Antártica. Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Microbiologia. **Campinas, SP: 2018.**

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: Aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, 25, 801, 2002

SINGER, A. C.; KIRCHHELLE, C.; ROBERTS, P.A. (Inter)nationalising the antibiotic research and development pipeline, **The Lancet Infectious Diseases**, 20, 2, 2, 2020.

SMITH, M. Antibiotic Resistance Mechanisms. **Journeys in Medicine and Research on Three Continents Over 50 Years**, May 2017, 95–99, 2017.

SMITH, S.C. et al. Enrichment of a Mixed Culture of Purple Non-Sulfur Bacteria for Hydrogen Production from Organic Acids. **Sustainability**, 15, 16607, 2023.

SOBOTTA, L. et al. Porphyrinoid photosensitizers mediated photodynamic inactivation against bacteria. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 175, p. 72–106, 2019.

STRATEN, D. V. et al. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. **Cancers**, v. 9, p. 19, 2017.

TAWIAH, A. A. et al. Antibiotic producing microorganisms from River Wiwi, Lake Bosomtwe and the Gulf of Guinea at Doakor Sea Beach, Ghana. **BMC Microbiology**, v. 12, 2012.

TAYEH, M. A.; MADIGAN, M. T. Malate Dehydrogenase in Phototrophic Purple Bacteria: Purification, Molecular Weight, and Quaternary Structure **Journal of Bacteriology**, p. 4196-4202 Vol. 169, No. 9, 1987.

TIGANOVA, I. G., ZHIZHIMOVA, Y. S., PHILIPOVA, N. I. Antibacterial properties of synthetic cationic bacteriochlorin derivatives as photosensitizers. **Molecular Genetics, Microbiology and Virology**, 35(4), 248–256, 2020.

TOMOVA, I. et al. Antimicrobial activity and resistance to heavy metals and antibiotics of heterotrophic bacteria isolated from sediment and soil samples collected from two Antarctic islands. **Frontiers in Life Science**, 8(4), 348–357, 2015.

ULIANA, M. P. et al. Fotossensibilizadores. In: BAGNATO, V. S.; INADA, N. M.; BLANCO, K. C. **Controle Microbiológico com ação fotodinâmica**. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2017. p. 45-63., 2017.

ULIANA, M.P., PIRES, L., PRATAVIEIRA, S. et al. Photobiological characteristics of chlorophyll derivatives as microbial PDT agents. **Photochem Photobiol Sci** 13(8):1137–1145, 2014.

VILAÇA, R. M. A. et al. Photosensitizers of natural origin: extraction, characterization, and recent advances in bacterial photoinactivation. **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v. 6, n. 5, p. 23436-23457, 2023.

WANG, J. et al. Antiviral Meroterpenoids Produced by the Antarctic Fungus *Aspergillus ochraceopetaliformis* SCSIO 05702. **Journal of Natural Products**, 79(1), 59–65, 2016.

World Health Organization (WHO), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Organisation for Animal Health (OIE), 2021 Antimicrobial Resistance Multi-Partner Trust Fund: Forging Tripartite collaboration for urgent global and country action against antimicrobial resistance (AMR) Annual Progress Report 2020.

YANG, Y., HU, Y., WANG, H. Targeting Antitumor Immune Response for Enhancing the Efficacy of Photodynamic Therapy of Cancer: Recent Advances and Future Perspectives. In **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Vol. 2016. 2016.

ZHANG, D. et al. *Rhodopseudomonas faecalis* sp. nov., a phototrophic bacterium isolated from an anaerobic reactor that digests chicken faeces **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 52, 2055-2060, 2002.

ZHAO, Y. et al. Structure of prodigiosin from *Serratia marcescens* NJZT-1 and its cytotoxicity on TSC2-null cells. **Food Sci. Technol**, Campinas, 41(Suppl. 1): 189-196, June 2021.

ZHU, Y.; HUANG, W.; YANG, Q. Clinical Perspective of Antimicrobial Resistance in Bacteria, **Infection and Drug Resistance**, 735 -746, 2022.

ZIGANSHYNA, S. et al. Tetrahydroporphyrin-tetratosylate (THPTS)-based photodynamic inactivation of critical multidrug-resistant bacteria in vitro. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 55(6), 2020.