

Caracterização óptica de materiais fotossensíveis

Optical characterization of photosensitive materials

RESUMO

Marina Estela Carraro
marinaestelacarraro@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Medianeira, Paraná,
Brasil

Leandro Herculano da Silva
leandroh@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Medianeira, Paraná,
Brasil

**Marcia Antonia Bartolomeu
Agustini**
marciaagustini@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Medianeira, Paraná,
Brasil

Flávio Dias Ferreira
flavioferreira@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Medianeira, Paraná,
Brasil

Este trabalho, teve como objetivo utilizar o azul de metileno como inibidor do crescimento de bactérias, analisando seus efeitos em três cepas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*. Inicialmente, o procedimento foi testado apenas na cepa de *Escherichia coli*. Para avaliar o azul de metileno como inibidor de crescimento da cepa de *Escherichia coli* utilizou-se o método de testes in vitro. Onde inicia-se pela ativação e fermentação da cepa da bactéria, seguido pelo isolamento da mesma através do método de esgotamento por estrias. Com a bactéria isolada é possível preparar e calibrar o inóculo da *Escherichia coli*, seguindo assim para o emplacamento das microplacas utilizadas no experimento. Com este passo finalizado foi possível aplicar o método da terapia fotodinâmica (TFD) em uma das placas, enquanto a outra, sob as mesmas condições de período e temperatura, não foi exposta a luminosidade. Posteriormente, deveria ser realizada a contagem de colônias isoladas do inóculo tratado e realizar a comparação com o número de colônias isoladas do inóculo não tratado, para que assim pudéssemos avaliar o efeito do azul de metileno juntamente com a TFD sob a cepa. Entretanto, a metodologia não pode ser concluída devido a ocorrência da paralisação das atividades em função da pandemia do Covid-19.

PALAVRAS-CHAVE: Terapia fotodinâmica. *Escherichia coli*. Azul de metileno.

ABSTRACT

This work aimed to use methylene blue as an inhibitor of the growth of bacteria, analyzing its effects in three strains: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella*. Initially, the procedure was tested only on the *Escherichia coli* strain. To evaluate methylene blue as a growth inhibitor of the *Escherichia coli* strain, the in vitro test method was used. Where it begins with the activation and fermentation of the bacterial strain, followed by its isolation through the streak depletion method. With the bacterium isolated, it is possible to prepare and calibrate the *Escherichia coli* inoculum, these proceeding to plate the microplates used in the experiment. With this finalized step, it was possible to apply the photodynamic therapy (PDT) method to one of the plates, while the other, under the same conditions of period and temperature, was not exposed to light. Subsequently, the count of colonies isolated from the treated inoculum should be performed and compared with the number of colonies isolated from the untreated inoculum, so that we could evaluate the effect of methylene blue together with the PDT under the strain. However, the methodology cannot be completed due to the interruption of activities due to the Covid-19 pandemic.

KEYWORDS: Photodynamic therapy. *Escherichia coli*. Methylene blue.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

Com a descoberta de possibilidades terapêuticas que podem ser desenvolvidas com a luz, a medicina passou a utilizar suas características como uma ferramenta de tratamento para determinadas doenças através das interações que ocorrem entre a luz e a epiderme. Uma dessas técnicas de tratamento é a Terapia Fotodinâmica (TFD). (OZOG, 2016)

A TFD utiliza o princípio da interação de luz de comprimento de onda adequado com o fotofármaco e o oxigênio. Esta interação gera espécies reativas, as quais são responsáveis por causar a apoptose celular. Deste modo, a técnica só ocorre com eficiência na presença de luz, fotofármaco e oxigênio. (SIBATA, 2000)

Para que iniciar um tratamento com TFD é necessário aplicar o fotofármaco no tecido biológico e em sequência irradiar luz, com comprimento de onda adequado. Ao ser irradiado com luz, o fármaco que está em seu estado normal passa para o estado excitado, conhecido como singleto (1O_2). Nesse estado, o oxigênio poderá passar por alguns processos radioativos, como a emissão de fluorescência, ou também, reagir com o tecido biológico. Além disso, o oxigênio singleto pode passar por processos não radioativos, nessas reações o 1O_2 sofre um processo de conversão, que o leva para o estado tripleto excitado (3O_2). (SIMPLICIO, 2002)

No estado tripleto, as moléculas podem passar por reação dos mecanismos do tipo I ou do tipo II. No mecanismo do tipo I ocorre transferência direta de elétrons entre o fotofármaco no estado tripleto e componentes do sistema, essa transferência forma vários radicais livres que resultam em produtos oxidados. Já no mecanismo do tipo II, o fotofármaco no estado tripleto transfere energia ao oxigênio molecular e resulta na geração do oxigênio singleto, um agente altamente citotóxico, ou seja, ele oxida biomoléculas causando sua morte. (FREITAS, 1992)

Este tipo de tratamento vem sendo utilizado em tumores, e, em outras doenças como ceratose actínica, úlceras venosas, osteomielites, degeneração macular da retina. A técnica da TFD passou a ser bastante procurada por ser um tipo de terapia pouco invasiva, além de possuir um mecanismo de ação considerado simples. Apesar de apresentar diversas vantagens em relação ao tratamento, os fotofármacos aprovados para uso na terapia fotodinâmica apresentam um elevado custo. (PINTO, 2013 e ISSA, 2010)

Devido a este fator, surgiu a necessidade de pesquisar e encontrar outros corantes que possam ser utilizados como fotofármacos, e, que possuam um custo mais acessível. Vários estudos vêm sendo desenvolvidos com uso de corantes alternativos, tais como, eosina, clorofila, azul de toluidina e azul de metileno. (WILSON, 2008)

Para que o corante seja considerado um bom fotofármaco, é necessário que este apresente algumas características específicas. Precisa apresentar compatibilidade com o tecido biológico, reagir apenas quando entrar em contato com a luz, deve produzir espécies reativas suficientes para a eficácia da técnica, ser eliminado rapidamente pelo organismo para evitar qualquer toxicidade e apresentar estabilidade fotoquímica. (SIMPLICIO, 2002)

Neste trabalho, utilizamos o azul de metileno como inibidor do crescimento de bactérias, analisando seus efeitos em três cepas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar o azul de metileno como inibidor de crescimento da cepa de *Escherichia coli* utilizou-se o método de testes in vitro. Inicialmente, é necessário realizar a ativação da cepa da bactéria. Após ativa, realiza-se a fermentação da *Escherichia coli*.

Para efetuar o processo de fermentação da cepa, preparou-se solução de 500 mL de água salina, utilizando 500 mL de água destilada e 0,85 g da NaCl em um Erlenmeyer, é necessário deixar a solução homogênea. Em seguida, preparou-se 500 mL de caldo EC, o qual é o meio de cultura específico para o crescimento da *Escherichia coli*. Para este, utilizou-se 18,5g de caldo EC e 500 mL de água destilada, também preparado em frasco Erlenmeyer e mantido sempre homogêneo.

Após o preparo destas soluções, a água salina é dividida em doze tubos de ensaios, cada um contendo um tubo de Durhan invertido. Posteriormente, os tubos de ensaios devidamente preparados e o Erlenmeyer contendo o caldo EC são autoclavados a 120 °C para a esterilização do material e para evitar a contaminação do experimento, os tubos devem ser autoclavados a meia rosca.

Logo após esterilizados, e, em temperatura mais amenas, com o auxílio de uma pipeta, coloca-se 7 mL do caldo EC em cada um dos tubos de ensaios preparados anteriormente e com uma alça de platina, devidamente esterilizada, coloca-se uma alíquota da bactéria, também, em cada tubo. Em seguida, os tubos são colocados na estufa por um período de 24 horas a 45 °C. Esta fase é chamada de presuntiva, e nesse período de estufa deve ocorrer o crescimento da bactéria, podendo ser identificado pela turbidez da amostra e presença de gás no tubo de Durhan.

O isolamento da bactéria é realizado nas placas de petri contendo meio de cultura. Para esta etapa, utilizou-se 500 mL de Eosin Metileno (EMB), preparado em um Erlenmeyer com 500 mL de água destilada e 18,75g de EMB. Logo após estar devidamente homogeneizado, o meio é esterilizado na autoclave a 120°C por 15 minutos. Logo após a esterilização, é necessário esperar o meio chegar a aproximadamente 45°C, pois, se esfriar muito ele pode solidificar.

Em seguida, separa-se doze placas de petri devidamente esterilizadas, e, ao redor da chama, despeja-se o EMB preparado preenchendo até a metade de cada uma das placas. As mesmas devem permanecer ao redor da chama até solidificarem, para evitar contaminação.

Com as placas prontas e com os tubos de ensaio fermentados, o seguinte passo foi realizar a semeadura da bactéria na placa utilizando os materiais já preparados. Esse processo é realizado através do esgotamento por estrias da *Escherichia coli* na placa de petri. O procedimento de estriamento deverá ser repetido para cada tubo fermentado, assim que finalizado, deve-se levar as placas de petri para a estufa, estas devem ficar na posição invertida e permanecer incubadas por 24 horas a uma temperatura de 37°C. Após esse período, as placas são levadas a geladeira para serem utilizadas quando necessário.

As colônias isoladas formadas no processo de esgotamento por estrias são utilizadas para o preparo do inóculo. O inóculo é uma amostra com a concentração adequada a ser utilizada no experimento. Ele é composto por aproximadamente 9 mL de água salina e a bactéria *Escherichia coli*, coloca-se a água salina em tubo de ensaio e para transferir a bactéria ao tubo de ensaio com água salina é realizada a raspagem com a alça de platina devidamente esterilizada, de 5 colônias, as quais foram isoladas anteriormente. Após transferidas para o tubo deve-se fazer a homogeneização da amostra com o auxílio do agitador Vortex.

O seguinte passo é realizar a calibração da concentração do inóculo com o padrão 0,5 da escala McFarland. É uma solução de turbidez padrão composta de sulfato de bário e ácido sulfúrico, que tem por finalidade padronizar a concentração bacteriana do inóculo. Seguindo esse padrão, o inóculo deve apresentar concentração entre 0,08 e 0,10.

Para realizar a leitura utiliza-se um espectrofotômetro configurado no método absorvância, com curva simples e comprimento de onda de 625nm. Posteriormente, coloca-se água destilada no compartimento do espectrofotômetro e realiza a primeira leitura. Esta leitura não gera nenhuma informação, serve como o branco das próximas substâncias.

O segundo passo é realizar a leitura do padrão de turbidez, é necessário homogeneizar bem antes de efetuar o teste. Anota-se o resultado apresentado, e, procede-se com a leitura do inóculo. Se este obter resultado dentro do normal do padrão, entre 0,08 e 0,10, o inóculo está pronto. Caso apresente um resultado menor é necessário aumentar a concentração deste, ou seja, com a alça de platina toca-se em mais algumas colônias e transfere-as para o inóculo. Por outro lado, se o resultado for acima do esperado, efetua-se a diluição do inóculo, aumentando o volume de água salina estéril.

Seguidamente do preparo e calibração do inóculo realiza-se o procedimento de emplacamento das microplacas utilizadas no experimento. Esta etapa é executada dentro da capela de fluxo laminar, responsável por criar uma área de trabalho totalmente estéril, evitando a contaminação durante todo o procedimento. Antes de realizar o emplacamentos é necessário preparar todo material a ser utilizado, nesse caso, preparou-se meio EC, utilizando 18,5g de caldo EC e 500 mL de água destilada; solução de azul de metileno com 25mL de água destila e 0,025g do corante azul de metileno, armazenado em frasco âmbar. Além destes, é necessário esterilizar na autoclave a 120°C todo o material que venha ser utilizado, como espátulas, microplacas, bastão de vidro, pipetas.

Com todo material preparado, inicia-se o processo de diluição, este procedimento deve ser feito igualmente em duas microplacas. Elas possuem 12 linhas e 8 colunas, destas, utilizou-se 12 linhas e 4 colunas. No primeiro poço das linhas A, B e C preencheu-se com 100 µL do Caldo EC, 100 µL do azul de metileno e 5 µL do inóculo. A linha D será utilizada como controle de fotodegradação, receberá em seu primeiro poço somente 100 µL do Caldo EC e 100 µL do azul de metileno. Da coluna 2 a 12 das microplacas todos os poços devem receber 100 µL de Caldo EC. A homogeneização das substâncias deve ser realizada com a própria pipeta, além disso, para cada linha deve-se utilizar uma pipeta para não ocorrer interferências.

Após o preenchimento do primeiro poço, deve-se coletar com a pipeta 100 µL deste e repassar essa solução para o poço seguinte. Isso deve ser feito das colunas 1 a 10, e 12, de todas as linhas, sempre homogeneizando e repassando 100 µL de solução, sendo que no último poço restará na pipeta essa mesma quantidade que deverá ser descartada. A coluna 11 da microplaca será o controle negativo, dessa maneira não recebe a solução diluída.

Logo após o processo de diluição, uma microplaca deve ir a estufa a 45 °C por aproximadamente 3 horas. A segunda microplaca deve ficar em outra estufa com as mesmas condições, porém, durante esse período ficará exposta a uma fonte de luz vermelha.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Logo após a retirada das microplacas da estufa, deve-se avaliar se o tratamento da TFD com azul de metileno foi eficaz. Deste modo, é necessário observar a quantidade de colônias de bactéria, e a partir desse número avaliar se houve ou não a inibição do crescimento destas. Assim, foram escolhidas duas linhas das microplacas para realizar o teste, sendo o controle positivo (linha 12) e a linha 6. O conteúdo de cada poço foram distribuídos em três placas, e, esperava-se observar o crescimento de bactérias ao menos nas placas correspondentes ao controle positivo. Porém, constatou-se que devido o volume do inóculo tratado ser muito baixo não ocorreu a homogeneização correta deste com o meio, e não houve crescimento bacteriano.

Desta maneira, houve a necessidade de buscar outro modo para realizar a contagem de colônias das microplacas. Com isso, iniciou-se um teste com o método de diluição, e a tentativa partiu da contagem do inóculo original, pois através deste sabe-se a quantidade inicial de colônias sem aplicação do tratamento, permitindo então realizar a comparação do número de colônias quando realizar a contagem do inóculo tratado.

Para isso, realizou-se um processo de diluição do inóculo original na seguinte sequência: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . Observou-se que as placas pertencentes as cinco primeiras diluições obtiveram crescimento de colônias, porém, as três primeiras estavam com uma quantidade muito grande de bactérias, não ocorrendo o isolamento das colônias. Por este motivo, escolheu-se a 10^{-4} para realizar a contagem, pois esta apresentava uma boa quantidade de colônias isoladas, a contagem foi realizada e calculada através do método de unidade formadora de colônia (UFC).

Com isso, observou-se que este modo de diluição poderia funcionar se utilizado no inóculo tratado, pois com apenas 100 µL foi possível obter crescimento de colônias e realizar o cálculo UFC do inóculo original. Porém, devido a paralisação em decorrência da pandemia mundial não foi possível executar a metodologia no inóculo tratado e desta forma não se obteve resultados.

CONCLUSÃO

Com o passar dos tempos a TFD tem sido escolhida como um tratamento alternativo para diversas doenças, e o desafio para encontrar fotofármacos

eficazes e com baixo custo, nos estimulou a testar o azul de metileno como inibidor do crescimento de bactérias, nas cepas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*.

O método inicialmente foi realizado apenas com a *Escherichia coli*, efetuando testes in vitro em ambiente controlado. A cepa foi ativada, isolada e a partir disso houve o preparo do inóculo original. Através do inóculo original pode-se dar prosseguimento a técnica, realizando o emplantamento de duas microplacas, o que nos permitiu colocá-las na estufa, ambas em mesmas condições de tempo e temperatura. Porém, apenas uma teve exposição a luz durante esse período.

Após todo esse procedimento deveria ocorrer a avaliação do desempenho do azul de metileno na inibição do crescimento da *Escherichia coli*, com e sem a exposição a luz. Entretanto, isso não foi possível em decorrência da paralisação das atividades em função da pandemia, assim como não foi possível empregar o método com as outras cepas que seriam testadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação Araucária de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (FA) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) que financiaram este projeto com bolsa e auxílio à pesquisa (processo n° 401160/2016-5), respectivamente.

REFERÊNCIAS

FREITAS, MAA.; PEREIRA, AHS.; FONTANA, LC.; FERREIRA-STRIXINO, J. **Terapia fotodinâmica com azul de metileno sobre a cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina**. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clínica*, 10(SUPPL. 3):3–6, 1992.

ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: Revisão da literatura e documentação iconográfica. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 85(4):501–511, 2010.

OZOG, D. M. et al. **Photodynamic Therapy**. *Dermatologic Surgery*, 42(7):804–827, 2016.

PINTO, G. **Eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana em biofilmes de *Staphylococcus Aureus* suscetível e resistente à metilina**. *Aleph*, 0–121, 2013.

SIBATA, C. H. et al. **Photodynamic therapy: A new concept in medical treatment**. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33(8):869–880, 2000.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. **Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos**. *Química Nova*, 25(5):801–807, 2002.