CINTIA RAMOS CAMARGO

**Desenvolvimento de membranas de quitosana com
fotossensibilizadores incorporados visando à
desinfecção de água**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi

São Carlos,
2012

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

CINTIA RAMOS CAMARGO

Título: "Desenvolvimento de membranas de quitosana com fotossensibilizadores incorporados visando à desinfecção de água"

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS -
GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA EESC - FMRP
- IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE
BIOENGENHARIA.

Aprovado em: 09/03/2012

PROF^a. DR^a. JANICE RODRIGUES PERUSSI
(ORIENTADORA)

Instituto de Química de São Carlos – USP

Resultado: aprovada

Assinatura: Janice

PROF^a. DR^a. ENY MARIA VIEIRA

Instituto de Química de São Carlos – USP

Resultado: Aprovada

Assinatura: Eny Maria Vieira

PROF^a. DR^a. ANA MARIA DE GUZZI PLEPIS

Instituto de Química de São Carlos – USP

Resultado: aprovada

Assinatura: Ana Maria de Guzzi Plepis

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof. Dra. Janice Rodrigues Perussi pela orientação e ensinamentos, os quais foram muito importantes para meu desenvolvimento e amadurecimento profissional e intelectual.

À Prof. Dra. Ana Maria de Guzzi. Plepis, à Dra. Virginia da Conceição Amaro Martins, à Ms. Wanessa de Cássia Martins Antunes de Melo, ao Danilo André Locilento, ao Lucas Fernandes Castro e à Yasmin de Oliveira Martins Fernandes pelos ensinamentos e colaboração para o desenvolvimento do trabalho.

A todos os amigos do laboratório do grupo de fotossensibilizadores e grupo de bioquímica e biomateriais do Instituto de Química de São Carlos, que fizeram parte da minha vida acadêmica.

À minha família por todo apoio e esforços para que eu realizasse e concluísse essa etapa de meus estudos

A CAPES e à FAPESP pelo auxílio financeiro

RESUMO

CAMARGO, Cintia Ramos. **Desenvolvimento de membranas de quitosana com fotossensibilizadores incorporados visando à desinfecção de água.** 2012. 65f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – EESC/ FMRP/ IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Métodos de desinfecção da água destinam-se à inativação de patógenos a fim de minimizar o risco de doenças transmitidas pela água. Estes métodos incluem tratamento com luz ultravioleta e processos químicos, para o qual cloro, dióxido de cloro, hipoclorito e ozônio são comumente utilizados. No entanto, métodos analíticos modernos revelam que estes métodos padrão de desinfecção da água podem levar à formação de produtos tóxicos e potencialmente cancerígenos. Desse modo, desenvolver métodos mais adequados para a desinfecção de água é uma necessidade. Inativação Fotodinâmica é uma nova abordagem para a eliminação de microrganismos patogênicos. Basicamente, esse processo utiliza fotossensibilizadores e luz para promover uma resposta fototóxica, normalmente oxidativa, capaz de danificar biomoléculas e estruturas celulares, provocando a morte dos microrganismos. No entanto, o fotossensibilizador não pode permanecer livre como um contaminante neste tipo de aplicação. Assim, o objetivo desse estudo foi o desenvolvimento de membranas de quitosana com fotossensibilizadores incorporados visando à desinfecção microbiológica da água. As membranas foram preparadas incorporando-se o azul de metileno, a rosa de bengala, *meso*-tetrakis (4-*N*-metilpiridil)-porfirina ou a 5,10,15,20-tetrakis(*p*-aminofenil)-porfirina. A eficiência do processo de Inativação Fotodinâmica com os fotossensibilizadores incorporados as membrana foi investigada empregando-se a bactéria *Escherichia coli* como modelo, já que esta bactéria está comumente presente em águas de abastecimento. Os resultados mostraram que, dentre os quatro fotossensibilizadores incorporados em membranas de quitosana, o processo fotodinâmico empregando a TMPyP se mostrou mais efetivo: 5 log de redução após 120 minutos de irradiação com LED branco e 4 log de redução após 120 e 140 minutos de irradiação com LED azul e amarelo, respectivamente. Além disso, com o intuito de simular uma situação real de desinfecção, um sistema circulatório de água, contendo membranas de quitosana/TMPyP reforçadas com nylon, foi empregado. Os resultados mostraram que o processo de fotoinativação dinâmico foi efetivo, apresentando 3 log de redução em 80 minutos de irradiação com LED branco. Estes resultados sugerem que o processo é efetivo para inativar bactérias contaminantes na água, empregando-se fotossensibilizadores incorporados em quitosana como suporte polimérico.

Palavras chave: Terapia fotodinâmica, fotoinativação, bactéria, desinfecção da água, quitosana.

ABSTRACT

CAMARGO, Cintia Ramos. **Development of chitosan membranes with photosensitizers incorporated aiming water disinfection.** 2012. 65f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – EESC/ FMRP/ IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Methods of water disinfection aim to inactivate pathogens in order to minimize the risk of waterborne diseases. These methods include treatment with ultraviolet light and chemical processes, for which chlorine, chlorine dioxide, hypochlorite and ozone are commonly used. However, modern analytical methods reveal that these standard methods of water disinfection may lead to the formation of toxic and potentially carcinogenic products. Thus, developing suitable methods for water disinfection is a necessity. Photodynamic inactivation is a new approach to eliminate pathogenic microorganisms. Basically, this process uses photosensitizers and light to promote a phototoxic response, normally oxidative, capable of damaging biomolecules and cellular structures, causing the death of microorganisms. However, the photosensitizer cannot remain free as a contaminant in this type of application. The objective of this study was to develop chitosan membranes with incorporated photosensitizers aiming the microbiological water disinfection. The membranes were prepared by incorporating methylene blue, rose bengal, *meso*-tetrakis (4-*N*-methylpyridyl)-porphine or the 5,10,15,20-tetrakis(*p*-aminophenyl)- porphyrin. The efficiency of the Photodynamic Inactivation with photosensitizers incorporated into the membrane was investigated using the bacteria *Escherichia coli* as a model, since this bacteria is commonly present in drinking water. The results showed that, among the four photosensitizers incorporated into chitosan membranes, the process employing the TMPyP was more effective: 5 log reduction after 120 minutes of irradiation with white LED and 4 log reduction after 120 and 140 minutes of irradiation with blue and yellow LED, respectively. Moreover, in order to simulate a real situation of disinfection, a water circulation system, containing TMPyP/chitosan membranes reinforced with nylon, was employed. The results showed that the process of photoinactivation using a dynamic system was effective, with about 3 log reduction in 80 minutes of irradiation with white LED. These results suggest that the process is effective to inactivate bacterial contaminants in water using photosensitizers incorporated into chitosan as a polymeric support.

Keywords: Photodynamic Therapy, photoinactivation, bacteria, water disinfection, chitosan.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA.....	10
2.2 QUITOSANA.....	14
2.3 ESCHERICHIA COLI	16
3. OBJETIVOS	18
4. METODOLOGIA.....	19
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA.....	19
4.1.1 DETERMINAÇÃO DO GRAU MÉDIO DE ACETILAÇÃO POR TITULAÇÃO CONDUTIMÉTRICA	19
4.1.2 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR MÉDIA POR VISCOSIMETRIA	19
4.1.3 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO	20
4.2 PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA	20
4.3 PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA COM FOTOSSENSIBILIZADORES INCORPORADOS	20
4.4 PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA REFORÇADAS COM NYLON	21
4.5 RETICULAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA	21
4.6 LIBERAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR NÃO IMOBILIZADO NAS MEMBRANAS DE QUITOSANA.....	22
4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FINAL DE FOTOSSENSIBILIZADOR NAS MEMBRANAS DE QUITOSANA ..	22
4.8 MICRORGANISMOS	22
4.8.1 PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO CELULAR	23
4.9 FONTE DE LUZ	23
4.10 FOTOINATIVAÇÃO UTILIZANDO FOTOSSENSIBILIZADOR INCORPORADO EM MEMBRANA DE QUITOSANA	24
4.11 FOTOINATIVAÇÃO UTILIZANDO FOTOSSENSIBILIZADOR EM SOLUÇÃO	25
4.12 FOTOINATIVAÇÃO UTILIZANDO SISTEMA CIRCULATÓRIO DE ÁGUA	25
4.13 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA DOS FOTOSSENSIBILIZADORES	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 DETERMINAÇÃO DO GRAU MÉDIO DE ACETILAÇÃO DA QUITOSANA	28
5.2 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR MÉDIA DA QUITOSANA	29
5.3 PREPARO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA	31
5.4 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	31
5.5 QUANTIFICAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR IMOBILIZADO NAS MEMBRANAS DE QUITOSANA	32
5.5.1 AZUL DE METILENO	33
5.5.2 ROSA DE BENGALA	34
5.5.3 5,10,15,20-TETRAKIS(P-AMINOFENIL)-PORFIRINA	35
5.5.4 MESO-TETRAKIS (4-N-METILPIRIDIL)-PORFIRINA	37
5.6 FOTOINATIVAÇÃO DE ESCHERICHIA COLI EMPREGANDO FOTOSSENSIBILIZADOR INCORPORADO EM QUITOSANA	39
5.6.1 AZUL DE METILENO	39
5.6.2 ROSA DE BENGALA	40
5.6.3 5,10,15,20-TETRAKIS(P-AMINOFENIL)-PORFIRINA	41
5.6.4 MESO-TETRAKIS (4-N-METILPIRIDIL)-PORFIRINA	43
5.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA DOS FOTOSSENSIBILIZADORES	45
5.8 FOTOINATIVAÇÃO DE ESCHERICHIA COLI EMPREGANDO TMPYP EM SOLUÇÃO	47
5.9 FOTOINATIVAÇÃO DE ESCHERICHIA COLI EMPREGANDO SISTEMA CIRCULATÓRIO DE ÁGUA	48
6. CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIORÁFICAS	51
APÊNDICE A - CURVAS PADRÃO DE ABSORBÂNCIA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS FOTOSSENSIBILIZADORES	61

**APÊNDICE B – DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE
FOTOSENSIBILIZADOR IMOBILIZADOS NAS MEMBRANAS DE QUITOSANA 63**

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A água é um recurso natural indispensável para a manutenção da vida no planeta e fundamental para o desenvolvimento da sociedade. O consumo de água vem aumentando com o passar do tempo; a industrialização, o aumento populacional e a migração para os grandes centros contribuíram para aumentar essa demanda. Entretanto, à medida que o processo de urbanização se intensifica, aumentam os riscos de transmissão de doenças vinculadas pela água. Isso acontece quando ela está contaminada com bactérias, vírus e outros agentes infecciosos ou tóxicos, como metais potencialmente tóxicos e hormônios (DOMINGUES et al, 2007; SZEWZYK et al, 2000). Portanto, o fornecimento de água potável de alta qualidade é uma necessidade que se torna cada vez mais difícil de ser atendida, pois apenas uma pequena quantidade de água em condições adequada está disponível para o consumo humano, apesar de a água ser abundante em nosso planeta (RICHARDSON, 2003; KULSHRESHTHA, 1998, SZEWZYK et al, 2000).

Os métodos de desinfecção de água têm como objetivo a inativação de microrganismos patogênicos a fim de minimizar o risco de doenças transmitidas pela água. Estes foram originalmente desenvolvidos para purificar a água de municípios e posteriormente foram utilizados para a descontaminação de esgoto sanitário. Tais métodos incluem filtração inicial de vários tipos, tratamento com luz ultravioleta e processos químicos (ACHER et al 1997; SZEWZYK et al, 2000; WOLFE, 1990). A desinfecção da água com agentes químicos é um dos métodos mais utilizados devido a sua eficácia e baixo custo (RICHARDSON, 2003). O método de desinfecção química é baseado no potencial de oxidação dos produtos químicos que podem danificar a parede celular de microorganismos e, eventualmente, causar danos letais aos mesmos. Os produtos químicos mais utilizados para a desinfecção de água de abastecimento público são: cloro, hipocloritos, cloramina, dióxido de cloro e ozônio (JEMLI et al, 2002). No entanto, há fatores que podem influenciar na eficácia desses produtos, tais como: sólidos em suspensão, materiais orgânicos e inorgânicos oxidáveis, oxigênio dissolvido, pH e temperatura (ACHER et al, 1997; RICHARDSON, 2007). Apesar de a desinfecção química fornecer bons resultados, métodos analíticos modernos para análise de água revelam a formação de subprodutos, como os trihalometanos, que são tóxicos e potencialmente cancerígenos em águas tratadas por esse método padrão de desinfecção sugerindo a inadequação desse método (DABROWSKA; NAWROCKI, 2009; JEMLI et al, 2002; RICHARDSON et al, 2007).

Além disso, tem havido relatos de surtos de doenças de veiculação hídrica provocadas por microrganismos patogênicos devido, principalmente, à alta capacidade de mutação dos microrganismos que levam ao desenvolvimento de resistência aos agentes antimicrobianos (WOLFE, 1990). Em virtude disso, as agências reguladoras de saúde pública alertam para a necessidade do desenvolvimento de novos métodos de desinfecção da água para consumo que não ponham em risco a saúde do homem e tenham alta eficácia de descontaminação.

Inativação Fotodinâmica (PDI, do inglês, *Photodynamic Inactivation*) é uma metodologia que utiliza fotossensibilizadores e luz para promover uma resposta fototóxica, normalmente oxidativa, capaz de danificar biomoléculas e estruturas celulares, provocando a morte e inibindo o crescimento de microrganismos (PERUSSI, 2007). Assim, purificação de água utilizando mecanismo de fotoinativação pode ser um método alternativo para a desinfecção de água contaminada com microrganismos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Inativação Fotodinâmica

Há vários grupos de moléculas que absorvem na região UV-visível do espectro eletromagnético que têm mostrado grande eficiência de geração de oxigênio singlete (REDMOND; GAMLIN, 1999). Fotossensibilizadores são corantes que apresentam elevado coeficiente de absorção no espectro eletromagnético na região da luz de excitação; alto rendimento quântico de geração de oxigênio singlete; alto rendimento quântico e longo tempo de vida do estado triplete, além da alta fotoestabilidade e baixa toxicidade no escuro (DeROSA; CRUTCHLEY, 2002). Fotossensibilizadores tais como fenotiazínicos, xantenos halogenados e porfirinas têm sido utilizadas para erradicação de microrganismos (ARROJADO et al, 2011; COOPER; GOSWAMI, 2002; ERGAIEG et al, 2008; KUZNETSOVA et al, 2007; SALMON-DIVON; NITZAN; MALIK, 2004)

Os corantes fenotiazínicos, como o azul de metileno (Figura 1), exibem intensa absorção de 550-700 nm (DeROSA; CRUTCHLEY, 2002). O tamanho, a forma planar, a área superficial e a carga formal positiva torna o azul de metileno um intercalante ideal em ácidos nucleicos (PERUSSI, 2007; WAINWRIGHT, 2002). Em virtude disso, este corante tem sido utilizado como um agente quimioterapêutico e em desinfecção viral de sangue (TARDIVO et al, 2005). A aplicação do azul de metileno como um fotossensibilizador para desinfecção de água tem sido testada em condições laboratoriais (ERGAIEG; SEUX, 2009; GERBA; WALLIS; MELNICK, 1977; JEMLI et al, 2002, KUZNETSOVA et al, 2007).

Figura 1: Estrutura química do azul de metileno

Os xantenos halogenados, como a rosa de bengala (Figura 2), são compostos cíclicos com três anéis aromáticos em arranjo linear com um átomo de oxigênio no centro do anel, que absorvem luz na região do visível. Uma característica importante dos corantes xantenos é que não se ligam à membrana celular e localizam-se no citoplasma. A rosa de bengala é um dos

compostos mais utilizados como sensibilizador para a produção de oxigênio singlete devido a sua alta solubilidade em água, alto rendimento quântico de oxigênio singlete e baixa taxa de fotodegradação (TSENG; FEENSTRA; WATSON, 1994; WRIGHT et al, 2002). Como fotossensibilizador, este corante pode matar microrganismos tais como bactérias e vírus (ALARCÓN et al, 2009; COOPER; GOSWAMI, 2002; ERGAIEG; SEUX, 2009; KUZNETSOVA et al, 2007; SCHÄFER et al, 2000).

Figura 2: Estrutura química da rosa de bengala

Porfirinas e seus análogos geralmente apresentam baixa citotoxicidade na ausência de luz, o que é importante em determinadas aplicações (BONNETT, 1995). Esses corantes podem ser transformados em moléculas catiônicas através da inserção de substituintes carregados positivamente nas posições periféricas do macrociclo tetrapirrólico (Figura 3). As porfirinas catiônicas *meso*-substituídas são conhecidas por apresentarem propriedades fotossensibilizantes—em comparação a outros compostos do tipo porfirina, em virtude destas fotoativarem eficientemente bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ERGAIEG et al, 2008; SALMON-DIVON; NITZAN; MALIK, 2004; REDDI et al, 2002; VILLANUEVA, 1993).

Figura 3: Macrociclo tetrapirrólico das porfirinas.

O mecanismo fotodinâmico exige a presença de oxigênio que é encontrado nas células e a ativação do fotossensibilizador que pode então reagir com moléculas na sua vizinhança por transferência de elétrons ou hidrogênio levando à produção de radicais livres (reação do tipo I) ou por transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), levando à produção de oxigênio singlete (MACHADO, 2000; SIMPLÍCIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002). Ambos os caminhos podem ocorrer simultaneamente sendo capazes de oxidar uma variedade de biomoléculas resultando na morte celular (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; LAMBRECHTS; AALDERS; MARLE, 2005). Uma vez que os compostos orgânicos insaturados são, de forma geral, suscetíveis à ação de oxigênio singlete, que reage com quase todos os componentes celulares, causando danos a muitas estruturas diferentes (MAISCH, 2007; MAISCH et al, 2007).

A inativação fotodinâmica apresenta a vantagem de possuir um largo espectro de ação, ou seja, o fotossensibilizador pode agir sobre bactérias (HAMBLIN; HASAN, 2004), fungos (DOVIGO et al, 2010) protozoários (ALOUINI; JEMLI, 2001) e vírus (WAINWRIGHT, 2004). No que diz respeito às bactérias, pode-se dizer que tanto as Gram-positivas quanto as Gram-negativas são susceptíveis à fotoinativação (MERCHAT et al, 1996), sendo que as Gram-positivas são mais facilmente danificadas. Isso é atribuído às diferenças na estrutura e na organização da parede celular dessas bactérias (MINNOCK et al, 1996). Em bactérias Gram-positivas, a porção externa da parede celular, é relativamente mais porosa, permitindo aos fotossensibilizadores neutros ou aniônicos se vincularem de forma eficiente e se difundirem para locais sensíveis da célula. Em bactérias Gram-negativas, a estrutura da membrana externa é mais complexa, formando uma barreira física e funcional entre a célula e o ambiente, tornando assim difícil a penetração do fotossensibilizador (ALVES et al, 2009; HAMBLIN; HASAN, 2004; MAISCH, 2009; TANG; HAMBLIN; YOW, 2007). No entanto, fotossensibilizadores catiônicos demonstraram eficácia para inativar bactérias Gram-negativas. A carga positiva da molécula do fotossensibilizador promove uma interação eletrostática com os sítios carregados negativamente na membrana externa das células bacterianas e, essa associação aumenta a eficiência dos processos de fotoinativação (COSTA et al, 2008; HAMBLIN; HASAN, 2004; MERCHAT et al, 1996; MINNOCK et al, 1996).

Existem trabalhos na literatura que sugerem o emprego da PDI para desinfecção microbiológica da água (CARVALHO et al, 2007; COOPER; GOSWAMI, 2002; DOVIGO et al, 2010; ERGAIEG; SEUX; 2009; GERBA; WALLIS, MELNICK; 1977; KUZBETSOVA et al, 2007; MANJÓN et al, 2010; SAVINO; ANGELI, 1985; SCHÄFER et al; 2000; WAINWRIGHT, 2004). A eficiência do tratamento de água utilizando a inativação fotodinâmica depende, entre outros fatores, da taxa de produção de oxigênio singlete em solução aquosa. A alta força de oxidação do oxigênio singlete pode ser utilizada para induzir danos nas biomoléculas, os quais conduzirão à perda da funcionalidade biológica levando à inativação da célula (FAUST et al, 1999). Assim, não existe resistência microbiana natural contra PDI, não importando se a cepa é resistente a uma ou mais classes de agentes antimicrobianos (CAMINOS; SPESIA; DURANTINI, 2006).

A aplicação da PDI em tratamento de água ainda está sob investigação. A maioria dos estudos realizados visando inativação de bactérias tem utilizado fotossensibilizadores em solução (ACHER et al 1990; ACHER et al, 1997). No entanto, isso não é apropriado para aplicações em processos de tratamento de água onde a presença de traços residuais de fotossensibilizador não seria aceitável. Cooper e colaboradores, 2002, por exemplo, usaram azul de metileno e rosa de bengala dissolvido homogeneamente em água para experimentos de desintoxicação em condições de laboratório e em uma escala de planta piloto.

Com o objetivo de resolver esse problema, estudos foram realizados utilizando fotossensibilizador imobilizados em suporte polimérico (BENABBOU et al, 2011; BONNETT et al, 2006; TODOROVA et al, 1999). Células de *Escherichia coli* (*E. coli*) foram inativadas quando as suspensões dessa bactéria em meio líquido foram irradiadas com luz visível na presença de poliestireno contendo rosa de bengala imobilizado (DAHL; MIDDEN; HARTMAN, 1987) e células de *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* foram irradiadas com luz visível na presença de celulose contendo 5,10,15,20-tetrakis(*N*-metilpiridíio)-porfirina (BONNETT; EVANS; GALIA, 1997). Nesses estudos, o mecanismo de ação dos fotossensibilizadores pode ter ocorrido de duas maneiras: (a) dano celular direto pelo oxigênio singlete gerado na superfície do filme e difundido para o microorganismo e (b) pela liberação lenta do fotossensibilizador na suspensão das células microbianas. Assim, como o segundo mecanismo não seria aceitável para a desinfecção da água, em virtude de que qualquer fotossensibilizador liberado pode contaminar água, há a necessidade de procurar outros sistemas.

2.2 Quitosana

Para a desinfecção da água utilizando o processo de PDI, Bonnett e colaboradores, 2006, propuseram o uso da quitosana como suporte polimérico, uma vez que a quitosana é insolúvel em água, favorecendo o contato entre a membrana contendo o fotossensibilizador e a suspensão aquosa de microorganismos (TODOROVA et al, 1999).

A quitosana é um polímero formado por longas cadeias de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas. Ela é a forma desacetilada da quitina e ambas não representam uma estrutura química única, são melhores definidos como copolímeros de unidades de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina, respectivamente. A Figura 4 apresenta uma representação das estruturas idealizadas de quitina e quitosana.

Figura 4: Representação das estruturas de (A) quitina e (B) quitosana.

A quitina é obtida de fontes naturais como crustáceos, moluscos, insetos, aracnídeos, fungos e algas. Há três formas de quitina conhecida: α , possui cadeias antiparalelas e apresenta grau de cristalinidade acima de 85%; β , possui cadeias paralelas e grau de

cristalinidade de aproximadamente 72% e γ , possui cadeias antiparalelas e paralelas e ainda não é muito conhecida (CAMPANA-FILHO et al, 2007). Como principal fonte fornecedora de quitina, os laboratórios utilizam os exoesqueletos de crustáceos e moluscos (CAMPANA-FILHO et al, 2007; MOURA et al, 2006; TAN et al, 1996). A quitosana por sua vez é obtida por um processo de desacetilação alcalina da quitina. Dependendo da origem do polímero e seu tratamento durante o processo de extração, a quitosana mostra cristalinidade e polimorfismo (DASH et al, 2011). A quitosana comercial geralmente apresenta um grau de desacetilação variando entre 70% e 90% e a massa molar na faixa de 10^4 - 10^6 g mol⁻¹ (ASSIS; BRITTO, 2008; DUTTA; DUTTA; TRIPATHI, 2004).

A quitina é insolúvel em solução aquosa e em solventes orgânicos, o que a torna de difícil aplicação para propósitos práticos. A quitosana, no entanto, é mais adequada para aplicações biológicas (DASH et al, 2011). A quitosana é insolúvel em água, ácidos concentrados, álcool e acetona; entretanto, é completamente solúvel em soluções de ácidos fracos (ácido acético, fórmico e cítrico) e ácidos inorgânicos diluídos (ácido clorídrico, nítrico, perclórico ou fosfórico) em pH menor que 6,0 (MOURA et al, 2006; KUMAR, 2000). A quitosana quando solubilizada em meio ácido, forma solução viscosa. Sua solubilidade está relacionada com a quantidade de grupos protonados (NH₃⁺) presentes, responsáveis pela repulsão eletrostática entre as cadeias e solvatação em água. O pKa dos grupos (NH₃⁺) é de aproximadamente 6,5, portanto aumentando-se o pH das soluções de quitosana acima deste valor a quitosana irá precipitar na forma de flocos gelatinosos (CHEN; HWA, 1996).

As principais características que fazem da quitosana um polissacarídeo de grande interesse para um número expressivo de aplicações são: possibilidade de ser quimicamente modificada; possibilidade de ser processada em diferentes formas (soluções, esponjas, filmes, membranas, gel, entre outros) e de ser um polieletrólito em meio ácido (KUMAR, 2000).

Além disso, a quitosana e seus derivados têm sido amplamente estudados em termos da atividade bacteriostática e bactericida (RABEA et al, 2003). Pesquisas mostram bons resultados da ação da quitosana na inibição do crescimento de bactérias, fungos e leveduras (NO et al, 2002; TSAI; SU, 1999; SILVA, 2005). O efeito antimicrobiano das soluções de quitosana testadas sobre microrganismos tem sido influenciado pelo grau de desacetilação, massa molar e concentração das soluções de quitosana bem como pelo do tempo de exposição destas às bactérias (ZHENG; ZU, 2003).

Zheng e Zhu, 2003, por exemplo, que investigaram o efeito antimicrobiano de soluções de quitosana de diferente massa molar, observaram que para *Staphylococcus aureus*, uma bactéria Gram-positiva, o efeito foi maior com o incremento da massa molar da

quitosana e, em contraste, para *E. Coli* (Gram-negativa), quitosana de menor massa molar ($<0,5 \times 10^4$ g mol⁻¹) melhor inativou esta bactéria. Além disso, os autores verificaram que os efeitos da quitosana foram diferentes para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O mecanismo de ação contra Gram-positivas pode ser devido à quitosana de alta massa molar formar na superfície da célula formar um filme, que impede a entrada de nutrientes, levando à morte celular. Em Gram-negativas, a quitosana de menor massa molar penetra na célula através de impregnação e, desde que a quitosana pode absorver e flocular substâncias eletronegativas na célula, isto perturba as atividades fisiológicas das bactérias e as mata.

2.3 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia*, assim denominado em homenagem a Theodor Von Escherich que descreveu a *Escherichia coli* em 1885, pertence à família das *Enterobacteriaceae* (CHEN; FRANKEL, 2005). Este gênero compreende as enterobactérias bacilares Gram-negativas anaeróbicas facultativas, móveis ou imóveis. Os microrganismos pertencentes ao gênero *Escherichia* são considerados membros do trato intestinal humano e de outros animais de sangue quente, possuindo um importante papel na manutenção da fisiologia intestinal e exercendo funções protetoras, impedindo a colonização e a proliferação de microrganismos oportunistas (MOXLEY; SMITH, 2010; SIITONEN, 1992).

No entanto, estudos têm mostrado que algumas linhagens de *Escherichia* são patogênicas (GAMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005; NATARO; STEINER; GUERRANT, 1998). Clones específicos de *E. coli*, denominados *E. coli* diarreio gênicos (DEC), não são membros da microbiota intestinal; são causadores de infecções intestinais sempre que alcançam esse sítio anatômico humano (NATARO; KAPER, 1998). Entre estes estão a *E. coli* enteropatogênico (EPEC) (McDANIEL et al, 1995) e *E. coli* enterohemorrágico (EHEC), patógenos que se adaptaram para causar infecções em diferentes hospedeiros através de mecanismos distintos de transmissão (TAILOR et al 1999). Estes microrganismos são responsáveis pelos sintomas de diarreia; estão envolvidos em infecções do tipo disentericas e em febres generalizadas, causando diarreias em crianças, idosos ou em indivíduos que apresentam deficiência imunológica (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). As EHEC causam a doença do intestino grosso que pode se apresentar como simples diarreia e, em seguida, avançar para fezes com presença de sangue com ulcerações do intestino. Em um

pequeno subgrupo de indivíduos doentes, depois de alguns dias, a doença evolui para uma forma severa, síndrome hemolítico-urêmica (do inglês "*hemolytic-uremic syndrome*", HUS), com risco de vida. HUS envolve uma tríade: anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiência renal (TAILOR et al, 1999). Nos países desenvolvidos, as EPEC são raras. A partir de 1960 ocorreu uma acentuada queda na quantidade de casos de doenças relacionados com essa bactéria. No Brasil, no entanto, as EPEC representam a principal causa de diarreia infantil desde os primeiros estudos nas décadas de 1950 e 1960. Isso ocorre principalmente devido às infecções hospitalares, à alimentação inadequada das crianças e ao saneamento básico precário. As infecções por EPEC são muito mais frequentes em crianças de família de baixa renda dos grandes centros urbanos (SABRÁ, 2002).

A presença de *E.coli* em água ou alimentos é um indicativo de contaminação com fezes humanas ou mais raramente de outros animais. A densidade de células de *E.coli* em cada mililitro de água é uma das principais medidas usadas no controle microbiológico de água potável nos municípios e preparados alimentares (TRABULSI, 2004). De acordo com a Portaria MS n.º 518/2004 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004), que define os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, estabelece que toda a água destinada ao consumo humano deve estar em conformidade com o padrão microbiológico e, assim, apresentar ausência de *E. coli* em 100 mL. Desse modo, a busca por métodos de desinfecção da água a partir da inativação da *E. coli* é de importância considerável.

3. OBJETIVOS

Esse estudo teve como objetivo o desenvolvimento de membranas de quitosana com fotossensibilizadores incorporados visando à desinfecção microbiológica da água. Com esse objetivo, as membranas foram preparadas incorporando-se o azul de metileno, a rosa de bengala, a *meso*-tetrakis (4-*N*-metilpiridil)-porfirina ou a 5,10,15,20-tetrakis(*p*-aminofenil)-porfirina, para verificar qual o fotossensibilizador é mais eficiente para essa finalidade. A eficiência do processo de Inativação Fotodinâmica foi investigada empregando-se bactéria *E. coli* como modelo, já que está comumente presente em águas de abastecimento. Para constatar a possibilidade de aplicação das membranas na inativação microbiológica da água de abastecimento em reservatórios, um fluxo circulatório de água foi empregado.

4. METODOLOGIA

4.1 Caracterização da quitosana

A quitosana de gládio de lula (*Loligo SP.*) utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Biomateriais do IQSC.

4.1.1 Determinação do grau médio de acetilação por titulação condutimétrica

A amostra de quitosana (250 mg), previamente seca, foi solubilizada em 50 mL de solução de ácido clorídrico $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e mantida sob agitação magnética por 24h. A solução obtida foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL e o seu volume foi ajustado com água destilada. Alíquotas de 50 mL da solução resultante foram tituladas com solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a temperatura de $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (SANTOS et al, 2003). As variações de condutância durante a titulação foram medidas através do condutivímetro Digimed, modelo DM-32.

4.1.2 Determinação da massa molar média por viscosimetria

A massa molar média da quitosana foi determinada por viscosimetria (SANTOS et al, 2003). A viscosidade de uma solução de quitosana em ácido diluído ou tampão pode ser descrita em função da viscosidade intrínseca e da concentração. Para isso, amostras de quitosana, previamente seca, foram preparadas com 20 mg de quitosana, em 25 mL de solução de ácido acético $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ sob agitação magnética por 24h. Depois, adicionou-se 25 mL de acetato de sódio $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ e a solução resultante foi mantida em agitação magnética por mais 24h. Alíquotas de 10 mL foram transferidas para um viscosímetro capilar de vidro do tipo Ubbelohde. As medidas de tempo de escoamento da solução do solvente e das soluções de quitosana foram realizadas a $25,0 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e o tampão ácido acético $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ /acetato de

sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ foi empregado para as sucessivas diluições, de modo a assegurar que a força iônica das soluções fosse mantida. Os tempos de escoamento correspondem à média de dez determinações independentes.

4.1.3 Espectroscopia de absorção no infravermelho

Para obtenção dos espectros de absorção na região do infravermelho as amostras de quitosana (1% massa/massa), com e sem fotossensibilizador, foram preparadas em ácido acético 1% (massa/massa) e transferidas para um suporte de silício e secas em estufa a vácuo. As medidas foram feitas em um Espectrofotômetro Bomem MB-102 (FTIR), com acúmulo de 32 varreduras, na faixa de operação de $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$.

4.2 Preparação das membranas de quitosana

O gel estoque de quitosana foi preparado na concentração de 1% (massa/massa) em ácido acético (1% massa/massa). Dez gramas do gel de quitosana foram colocadas em fôrmas de teflon® com $4,7 \times 4,7 \text{ cm}$ de lado e $0,7 \text{ cm}$ de profundidade. As fôrmas foram mantidas em uma câmara com fluxo de ar por três dias, para evaporação do solvente. A preparação das membranas foi realizada no Laboratório de Biomateriais do IQSC com a colaboração da Prof. Dra. Ana Maria G. Plepis e da Dra. Virginia da Conceição Amaro Martins.

4.3 Preparação das membranas de quitosana com fotossensibilizadores incorporados

As soluções-estoque dos fotossensibilizadores foram preparadas na concentração de 1 mg mL^{-1} em álcool etílico e armazenadas no escuro a 4°C . Uma alíquota de $0,7 \text{ mL}$ da solução-estoque do fotossensibilizador foi adicionada a 10 g do gel de quitosana 1% (massa/massa) em ácido acético (1% massa/massa). A mistura foi homogeneizada, colocada em fôrmas de teflon® mantidas em câmara de fluxo de ar por três dias. Os fotossensibilizadores empregados foram azul de metileno (AM, Sigma Aldrich- EUA), rosa

de bengala (RB, Vetec Química-Brasil), *meso*-tetrakis (4-*N*-metilpiridil)-porfirina (TMPyP, Midcentury Chemicals- EUA) e 5,10,15,20-tetrakis(*p*-aminofenil)-porfirina (p-TAPP, Sigma Aldrich- EUA).

4.4 Preparação das membranas de quitosana reforçadas com nylon

As membranas de quitosana preparadas como descrito anteriormente possuem uma espessura fina ($< 0,1\text{mm}$) e apresentam certa fragilidade. Em virtude disso, as membranas de quitosana preparadas para serem utilizadas no sistema circulatório de água foram feitas incorporando-se uma rede de nylon de espessura $0,45 \pm 0,01\text{ mm}$ e malha $2,38 \pm 0,01\text{ mm}$, com o objetivo de reforçar as membranas (BONNETT et al, 2006). O processo de preparação das membranas de quitosana com e sem fotossensibilizador foi feito conforme descrito anteriormente, exceto pelo fato de que um fragmento de uma rede de nylon ($4,5 \times 4,5\text{ cm}$) foi colocado no fundo das fôrmas de teflon® antes da etapa de evaporação. A espessura das membranas reforçadas com nylon foi medida usando micrômetro Mitutoyo. A espessura obtida corresponde à média de dez medições independentes.

4.5 Reticulação das membranas de quitosana

As propriedades de retenção de água e a biodegradabilidade da quitosana podem ser controladas por ligações cruzadas entre suas cadeias. Para tornar a quitosana quimicamente mais resistente mecanicamente, os grupos amino devem ser bloqueados com agentes de reticulação, que incluem o tripolifosfato de sódio (TPP). Assim, com o objetivo de obter a reticulação, depois de secas as membranas de foram tratadas em solução 0,5% (massa/massa) de TPP (Labsyth- Brasil) em NaOH 2 mol L^{-1} por cerca de 30 min. As membranas foram então lavadas com água deionizada de grau Milli Q, secas e armazenadas à temperatura ambiente (25°C). Outras concentrações de solução de TPP foram testadas, mas a que apresentou melhores resultados frente a fragmentação e ao intumescimento das membranas de quitosana, com e sem fotossensibilizador, reforçadas ou não com rede de nylon, foi a descrita anteriormente.

4.6 Liberação do fotossensibilizador não imobilizado nas membranas de quitosana

As membranas contendo o fotossensibilizador preparadas nas fôrmas de teflon® (área de 22 cm²) foram colocadas em 200 mL de água destilada-sob agitação mecânica por três dias ou até que não se observasse mais resíduos de fotossensibilizador na água, significando que todo excesso de fotossensibilizador foi liberado da membrana. A cada 12h a água dos béqueres foi trocada. Espectros de absorbância foram obtidos ao longo desse tempo com o intuito de verificar a ausência de fotossensibilizador em amostras de água.

4.7 Determinação da concentração final de fotossensibilizador nas membranas de quitosana

Após a liberação do fotossensibilizador que não ficou imobilizado, uma massa conhecida de membrana de quitosana foi dissolvida em ácido acético 1% (massa/massa). A partir dessa solução foi obtido o espectro de absorção do fotossensibilizador incorporado, e sua concentração foi determinada por interpolação em curva padrão de absorbância em função da concentração do fotossensibilizador. Essa curva foi obtida previamente através de solução de fotossensibilizador em ácido acético 1%. As medidas de absorbância foram obtidas em um espectrofotômetro (Hitachi U2800, Japão)

4.8 Microrganismos

Uma cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922), gentilmente cedida pelo Prof. José Francisco Hoffling do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Diagnóstico Oral da UNICAMP, foi empregada como modelo de bactéria uma vez que é o tipo mais comum encontrado em água.

4.8.1 Preparação da suspensão celular

A partir da cepa bacteriana, foi preparada uma suspensão padronizada contendo 1×10^9 células mL^{-1} . Para o preparo dessa suspensão, *E. coli* foi cultivada em Agar Infusão cérebro-corção - BHI (*Brain Heart Infusion*- Oxoid, São Paulo, Brasil) e mantida na estufa de cultura bacteriológica (Modelo 002 CB - Fanem, São Paulo) por 48 h a 37°C. A seguir, a bactéria foi inoculada em caldo LB (Luria-Bertani Broth - Oxoid, São Paulo, Brasil) e mantida a 37° C por 18 h no agitador orbital (MA 410 Marconi, Piracicaba, Brasil) a 100rpm. Após o período de incubação dos microrganismos em caldo nutritivo, o pellet foi obtido por centrifugação (Centrífuga Excelsa II – Fanem, São Paulo) a 1300 rpm por 10 minutos e suspenso em 10 mL de solução fisiológica estéril. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes e a contagem do número de células na suspensão foi feita através da determinação da absorbância em 590 nm em espectrofotômetro (Hitachi U2800, Japão).

4.9 Fonte de Luz

Os experimentos realizados no sistema estático empregaram uma mesa de iluminação composta de uma série de LEDs (Figura 5), chamada de Biotable, desenvolvida pelo Grupo de Ótica do IFSC/CEPOF-USP com a colaboração Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato. Utilizou-se o sistema com o LED azul (452 ± 30 nm) para as porfirinas, amarelo (590 ± 30 nm) para rosa de bengala e porfirinas e vermelho (630 ± 30 nm) para azul de metileno, em virtude de esses fotossensibilizadores possuírem absorção em torno desses comprimentos de onda. A potência do LED azul corresponde a 14 mW cm^{-2} , a do LED amarelo a 10 mW cm^{-2} e a do LED vermelho a 18 mW cm^{-2} . Para os experimentos realizados no sistema dinâmico, ou seja, com a suspensão de bactérias em circulação, foi montado um aparato utilizando sistema de LEDs brancos (400-700 nm, $3 \times 10^3 \text{ mW cm}^{-2}$, Empalux, modelo IE33001, Figura 6), com o intuito de simular a luz solar. O aparato com LEDs brancos também foi empregado em experimentos realizados no sistema estático.

Figura 5: Biotable constituído de mesa de iluminação composta por LEDs amarelo.

Figura 6: Aparato de iluminação composto de LEDs brancos empregado nos ensaios com fluxo circulatório.

4.10 Fotoinativação utilizando fotossensibilizador incorporado em membrana de quitosana

As membranas em estudo (área de superfície 1 cm^2) foram colocadas em cada um dos poços de uma placa de poliestireno com 24 poços (Costar Corning) e submersas com 1,2 mL de suspensão bacteriana de concentração conhecida (1×10^7 células mL^{-1}). A placa foi irradiada empregando o Biotable no comprimento de onda adequado. Alíquotas de 0,1 mL da suspensão foram retiradas ao longo do tempo de irradiação e o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC mL^{-1}) foi determinado em função do tempo. Os testes foram feitos em triplicatas e os experimentos controle foram realizados também com a membrana de quitosana sem sensibilizador e com a membrana de quitosana com fotossensibilizador sem

irradiação (no escuro) com a finalidade de verificar a citotoxicidade da membrana com o fotossensibilizador.

4.11 Fotoinativação utilizando fotossensibilizador em solução

Os testes de fotoinativação empregando fotossensibilizador livre (sem estar imobilizado em suporte polimérico) foram feitos para verificar a citotoxicidade do fotossensibilizador em solução na concentração incorporada na membrana de quitosana. Em uma placa de poliestireno com 24 poços (Costar Corning) foram colocadas 1,2 mL de solução do fotossensibilizador em dimetilsulfóxido ($4 \mu\text{mol L}^{-1}$) e 1,2 mL de suspensão bacteriana de concentração conhecida (1×10^7 células mL^{-1}). Após 5 minutos de incubação a 37°C no agitador orbital (MA 410 Marconi, Piracicaba, Brasil) a 100 rpm, a placa foi exposta à irradiação até se obter inativação completa das bactérias. Alíquotas de 0,1 mL da suspensão foram retiradas em intervalos adequados para a determinação das UFC mL^{-1} . Experimentos controle foram realizados sem sensibilizador e irradiação e com fotossensibilizador no escuro. Todos os testes foram feitos em triplicata.

4.12 Fotoinativação utilizando sistema circulatório de água

O aparato do sistema circulatório de água foi construído empregando-se uma caixa de acrílico (30 cm de comprimento por 10 cm de largura contendo 283 mL de água com bactérias em suspensão, mostrado na Figura 7) e uma borracha de silicone ligada a uma bomba submersa Sarlo Better. As membranas de quitosana reforçadas com nylon e contendo os fotossensibilizadores foram fixadas a bastidores de plástico (4,5 cm de diâmetro, Figura 8a), a fim de evitar dobras das membranas. Os bastidores foram então acoplados a placas de acrílico, fixadas à caixa, como mostrado na Figura 8b. Para os testes em sistema dinâmico foram empregadas seis membranas de quitosana colocadas em paralelo a uma distância de 3 cm uma da outra. A vazão empregada foi de 25 mL min^{-1} , correspondendo a um tempo de ciclo de 11,32 minutos. Em intervalos apropriados alíquotas (3 mL) foram retiradas para determinação das UFC mL^{-1} . Os testes foram repetidos três vezes.

Figura 7: Caixa de acrílico do sistema circulatório de água contendo seis encaixes para a colocação de seis membranas em paralelo.

(A)

(B)

Figura 8: Membrana de quitosana sem fotossensibilizador e reforçada com nylon (A) fixada em bastidor de plástico e acoplada à placa de acrílico, presa à caixa

4.13 Determinação da atividade fotodinâmica dos fotossensibilizadores

O teste do ácido úrico (FISCHER et al, 1998) foi empregado para determinar a eficiência fotodinâmica dos fotossensibilizadores em solução. A atividade fotodinâmica foi determinada empregando a equação 1, que utiliza a variação da absorbância em 293 nm, antes e após a irradiação de uma solução contendo ácido úrico e fotossensibilizador. Para isso, solução de ácido úrico (AU, Sigma- EUA) e fotossensibilizador foram preparadas, respectivamente na concentração $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ em tampão fosfato (pH 7,4). As amostras foram irradiadas por 5 minutos a temperatura ambiente utilizando o sistema de irradiação (Biotable) no comprimento de onda adequado de acordo com cada fotossensibilizador presente na solução sob agitação para manter a saturação de oxigênio. As medidas de absorbância foram obtidas em um espectrofotômetro (Hitachi U2800, Japão).

$$PA = \frac{\Delta A_{AU} * 10^5}{E_0 * t * A_{FS}(\lambda_{irr})}$$

Equação 1

Sendo

PA = atividade fotodinâmica ($\text{m}^2 \text{W}^{-1} \text{s}^{-1} = \text{m}^2 \text{J}^{-1}$)

ΔA_{AU} = variação da absorbância da solução AU/fotossensibilizador em 293 nm após irradiação.

E_0 = potencia da irradiação (W m^{-2})

t = tempo de irradiação (segundos)

$A_{FS}(\lambda_{irr})$ = absorbância do fotossensibilizador na solução AU/fotossensibilizador no comprimento de onda de irradiação

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação do grau médio de acetilação da quitosana

O grau médio de acetilação da quitosana foi determinado por condutimetria (SANTOS et al, 2003), que se trata de uma titulação de uma mistura de ácido forte e de um ácido fraco (quitosana em ácido clorídrico) utilizando uma base forte (NaOH) como titulante. A curva condutimétrica da amostra de quitosana com solução de NaOH e excesso ácido clorídrico (Figura 9) mostra três ramos lineares, onde o primeiro corresponde à neutralização do ácido presente, o segundo à desprotonação dos grupos amino da quitosana e o terceiro ao excesso de base, após o ponto de equivalência. Estas três retas originam por extrapolação dois pontos de inflexão (V_1 e V_2), que correspondem ao volume da base necessário para neutralizar os grupos amina protonados.

Figura 9: Curva de titulação condutimétrica das amostras de quitosana. Os pontos apresentados no gráfico referem-se à média de dois experimentos independentes.

O grau médio de acetilação e desacetilação da amostra de quitosana foi determinado empregando-se as equações 2 e 3, respectivamente:

$$\% \overline{GA} = \left(1 - \frac{161 * (V_2 - V_1) * [NaOH]}{m} \right) * 100 \quad \text{Equação 2}$$

$$\% \overline{GD} = 100 - \% \overline{GA} \quad \text{Equação 3}$$

Sendo:

$\% \overline{GA}$ = Grau médio de acetilação (em porcentagem)

$\% \overline{GD}$ = Grau médio de desacetilação (em porcentagem)

161 = Massa molar média da unidade repetitiva de quitosana (g mol^{-1})

$V_2 - V_1$ = Volume de base consumido para neutralizar a quitosana (mL)

$[NaOH]$ = Concentração da solução de hidróxido de sódio (mol L^{-1})

m = Massa de quitosana contida na alíquota titulada (g)

A titulação foi feita em duplicata e o grau médio de acetilação e desacetilação obtidos foram $9,00 \pm 0,17$ e $91 \pm 0,17\%$, respectivamente. Os resultados obtidos indicam que a quitosana apresenta grupos amino protonáveis, sendo solúvel em soluções diluídas de ácidos em pH abaixo de 6,0. A solubilidade da quitosana depende do grau de desacetilação (BEPPU; ARRUDA; SANTANA, 1999; DASH et al, 2011).

5.2 Determinação da massa molar média da quitosana

A viscosimetria é um dos processos mais utilizados para determinar a massa molar de polímeros (SANTOS et al, 2003). A viscosidade de um polímero em ácido diluído ou tampão pode ser descrita em função da sua viscosidade intrínseca. A viscosidade intrínseca da amostra de quitosana foi determinada pela extrapolação da equação da reta (Figura 10) resultante da aplicação da relação de Huggins para a condição de diluição infinita (equação 4).

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k_H [\eta]^2 C \quad \text{Equação 4}$$

Sendo: η_{sp} a viscosidade específica; $\frac{\eta_{sp}}{C}$ a viscosidade reduzida (mL g^{-1}); $[\eta]$ a viscosidade intrínseca (mL g^{-1}), k_H a constante de Huggins e C a concentração da solução (g mL^{-1})

Figura 10: Curva de viscosidade reduzida versus concentração da amostra de quitosana

A viscosidade intrínseca obtida foi $1261,314 \text{ mL g}^{-1}$. Através da relação de Mark-Houwink (equação 5) obteve-se a massa molar média viscosimétrica de $1,248 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$, sendo considerada uma quitosana de média massa molar (CAMPANA-FILHO et al, 2007; MOURA et AL, 2006; DASH et al 2011).

$$[\eta] = K \cdot \overline{M}_v^\alpha \quad \text{Equação 5}$$

Sendo: $\overline{M}_v$ a massa molar média viscosimétrica, α constante característica da geometria da molécula e do polímero, K constante característica do polímero e depende da temperatura e do solvente. Os valores de α e K utilizados foram 0,800 e 0,074, respectivamente (RINAUDO, 2006).

5.3 Preparo das membranas de quitosana

No presente trabalho, quatro fotossensibilizadores de classes diferentes (duas porfirinas, um fenotiazínico e um xanteno halogenado) foram incorporados em quitosana pelo método de adição (BONNETT et al, 2006). As membranas de quitosana preparadas, com e sem fotossensibilizador, são translúcidas com cerca de $60,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$ de espessura para as membranas sem rede de nylon e $120,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$ para as reforçadas com rede de nylon.

As membranas de quitosana com fotossensibilizador, quando colocadas em água (Milli-Q), intumesceram e começaram a fragmentar. O TPP é um agente reticulante, que interage com a quitosana através de forças eletrostáticas, formando uma rede de ligações cruzadas iônica que torna a quitosana mais resistente para inibir sua dissolução (MI et al, 2003; SU et al 2011). Assim, as membranas de quitosana com e sem fotossensibilizador, reforçadas ou não com rede de nylon, foram tratadas com solução 0,5% de TPP em NaOH 2 mol L^{-1} com o intuito de conferir ao material uma maior estabilidade frente à fragmentação e um menor intumescimento.

5.4 Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho permite caracterizar bandas de absorção importantes de qualquer composto e é uma das técnicas mais utilizadas para a caracterização do polímero quitosana e seus derivados (BRUGNEROTTO et al, 2001).

A Figura 11 apresenta os espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de gel de quitosana com e sem fotossensibilizador incorporado. Nos espectros da quitosana e quitosana/fotossensibilizador observam-se duas bandas em torno de 2900 cm^{-1} . Estas bandas são atribuídas ao estiramento C-H (BRUGNEROTTO et al, 2001; TIRKISTANI, 1998). A banda intensa e larga na região de 3300 cm^{-1} é atribuída a deformações axiais de OH e NH correspondente as ligações de hidrogênio intermoleculares (XU; KIM; HANNA, 2005). Nos espectros, a banda em 1550 cm^{-1} está relacionada com a deformação angular N-H (amida II), 1150 cm^{-1} é devido à deformação axial de O-H na ligação de hidrogênio, entre 1600 e 1670 cm^{-1} as bandas correspondem ao estiramento C=O da amida I, uma vez que a quitosana não é totalmente desacetilada (JOSUÉ et al, 2000) e entre 800 e 1200 cm^{-1} as bandas são características deste polímero e estão relacionados com anéis piranosídicos (SHIGEMASA et

al, 1996). A comparação dos espectros de quitosana e quitosana/fotossensibilizador sugere que os fotossensibilizadores, quando presentes, não levaram a mudanças na estrutura da quitosana uma vez que suas bandas características permaneceram inalteradas.

Figura 11: Espectros de infravermelho da membrana de quitosana (A) sem fotossensibilizador e contendo (B) AM, (C) RB, (D) p-TAPP e (E) TMPyP incorporado.

5.5 Quantificação do fotossensibilizador imobilizado nas membranas de quitosana

Com o intuito de garantir que durante os testes de PDI o fotossensibilizador não fosse liberado das membranas de quitosana, testes de liberação do excesso de fotossensibilizador do suporte polimérico foram realizados. A seguir foi determinada a concentração final de corante incorporado por interpolação em curva padrão de absorbância em função da concentração. As curvas de calibração bem como os dados utilizados para interpolação e os resultados obtidos estão apresentadas nos Apêndice A e B, respectivamente.

A Figura 12 mostra as membranas de quitosana desenvolvidas com fotossensibilizador incorporado, após os testes de liberação do fotossensibilizador não imobilizado terem sido feitos.

Figura 12: Membrana de quitosana 1% em ácido acético 1% contendo (A) RB (B) AM, (C) TMPyP e (D) p-TAPP depois do teste de liberação do excesso de fotossensibilizador.

5.5.1 Azul de metileno

A Figura 13 mostra o espectro de absorção do AM em ácido acético 1% e o obtido através da dissolução das membranas de quitosana em ácido acético 1%, das quais o excesso de fotossensibilizador foi previamente liberado. Nos espectros observa-se máximo de absorbância do AM em ácido acético 1% em 665nm, enquanto o espectro da dissolução da membrana tem máximo em torno de 600 nm, indicando agregação do AM, formando dímeros (SEVERINO et al, 2003; TARDIVO et al , 2005). A formação de agregados pode diminuir a eficiência do fotossensibilizador, uma vez que ocorrem decaimentos não radioativos por conversão interna, dificultando a transferência de energia para o oxigênio no estado fundamental (RIBEIRO et al, 2007; RONCHI et al, 2007).

Figura 13: Espectro de absorção do AM obtidos a partir da (A) solução do fotossensibilizador em ácido acético 1% e (B) dissolução da membrana de quitosana/fotossensibilizador em ácido acético 1%.

A partir dos dados dos espectros de absorção foi possível determinar que $0,01830 \pm 0,00003$ mg/g ($\text{massa}_{\text{fotossensibilizador}}/\text{massa}_{\text{suporte polimérico}}$) do fotossensibilizador foi incorporado no suporte polimérico, que corresponde a $5,00 \pm 0,10$ $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AM em 1,0 g de membrana de quitosana (Apêndice B). Não é possível comparar esse resultado com os encontrados na literatura (NORONHA, 2010), pois apesar do corante ser o mesmo, o material das membranas e a aplicabilidade para a qual as membranas foram desenvolvidas é diferente. Estudos que incorporam AM em suporte polimérico, como membranas à base de colágeno, utilizam a concentração de fotossensibilizador liberado em função do tempo de incubação em saliva artificial para verificar o efeito fotodinâmico deste contra a *Candida albicans* (NORONHA,2010).

5.5.2 Rosa de bengala

Analisando o espectro de absorção da RB em ácido acético 1% e o obtido a partir da dissolução das membranas de quitosana/RB em ácido acético 1%, das quais o excesso de corante foi previamente liberado (Figura 14) verifica-se o máximo de absorbância em torno de

554 e 565 nm, respectivamente; observando um pequeno deslocamento para o vermelho devido à mudança do ambiente (*bathochromic shift*) (BONNETT et al, 2006). Utilizando os dados obtidos através dos espectros de absorção do fotossensibilizador determinou-se que $0,01700 \pm 0,00100$ mg/g (massa fotossensibilizador/massa suporte polimérico) da RB foi incorporada nas membranas de quitosana, que corresponde a $3,50 \pm 0,30 \mu\text{mol L}^{-1}$ do fotossensibilizador por grama de membrana de quitosana (Apêndice B). Também neste caso, os resultados não podem ser comparados com os encontrados na literatura, pois o material do suporte polimérico (poliestireno) é diferente e o mecanismo da ação do fotossensibilizador incorporado não é aceitável para a desinfecção da água, uma vez que o efeito fotodinâmico pode ter sido através da liberação lenta do RB na suspensão celular (DAHL; MIDDEN; HARTMAN, 1987).

Figura 14: Espectro de absorção da RB obtidos a partir da (A) solução do fotossensibilizador em ácido acético 1% e (B) dissolução da membrana de quitosana/fotossensibilizador em ácido acético 1%.

5.5.3 5,10,15,20-tetrakis(p-aminofenil)-porfirina

Nos espectros da p-TAPP (Figura 15) obtidos a partir da dissolução das membranas de quitosana/p-TAPP em ácido acético 1%, das quais o excesso de corante foi previamente liberado e da porfirina em ácido acético 1%, observa-se banda de Soret em torno de 416 nm e

um pequeno deslocamento para o vermelho das bandas-Q (500-600 nm) no espectro da porfirina obtido por meio da dissolução das membranas de quitosana. Bonnett e colaboradores (2006) obtiveram resultados semelhantes aos observados, mostrando deslocamento para o vermelho dos valores de máximos de absorção da p-TAPP incorporada em membrana de quitosana. Empregando os dados obtidos através dos espectros foi possível determinar que $0,00730 \pm 0,00060$ mg/g ($\text{massa fotossensibilizador/massa suporte polimérico}$) da porfirina foi incorporada no suporte polimérico, correspondendo a $1,00 \pm 0,10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de p-TAPP em 1,0 g de membrana de quitosana (Apêndice B). Resultados na literatura mostram que cerca de $5 \mu\text{g cm}^{-2}$ de p-TAPP foram incorporados em membranas de quitosana, sendo que $7,5 \mu\text{g cm}^{-2}$ foram adicionadas ao gel de quitosana antes da secagem das amostras e portanto a quantidade de p-TAPP incorporada em membranas de quitosana foi menor do que a adicionada (BONNETT et al, 2006). Isso proporciona uma alta eficiência de incorporação de aproximadamente 67%.

Figura 15: Espectro de absorção da p-TAPP obtidos a partir da (A) solução do fotossensibilizador em ácido acético 1% (B) dissolução da membrana de quitosana/fotossensibilizador em ácido acético 1%. O espectro apresentado em (C) refere-se à solução de p-TAPP em concentração 10x maior.

5.5.4 Meso-tetrakis (4-N-metilpiridil)-porfirina

A Figura 16 apresenta os espectros de absorção da solução de TMPyP em ácido acético 1% bem como o espectro dos corante obtido através da dissolução das membranas de quitosana em ácido acético 1%, das quais o excesso de fotossensibilizador foi previamente liberado. Nos espectros observa-se banda Soret em torno de 425 nm em todos os espectros, e apenas um pequeno deslocamento para o vermelho (*bathochromic shift*) das bandas-Q (500-600 nm) no espectro da porfirina obtido por meio da dissolução das membranas de quitosana (BONNETT et al, 2006).

Figura 16: Espectro de absorção da TMPyP obtidos a partir da (A) solução do fotossensibilizador em ácido acético 1% e (B) dissolução da membrana de quitosana/fotossensibilizador em ácido acético 1%. O espectro apresentado em (C) refere-se à solução de TMPyP em ácido acético em concentração 10x maior.

A partir dos dados dos espectros de absorção foi possível determinar que $0,02700 \pm 0,00100$ mg/g (massa fotossensibilizador/massa suporte polimérico) de TMPyP permaneceu incorporado nas membranas quitosana/TMPyP, o que corresponde a $2,00 \pm 0,04$ $\mu\text{mol L}^{-1}$ da porfirina por grama de membrana de quitosana (Apêndice B). Até o presente momento não existe na literatura trabalhos publicados utilizando TMPyP incorporada em suporte

polimérico.

A análise dos resultados da quantificação de fotossensibilizador imobilizado nas membranas de quitosana obtidos para os quatro corantes sugere-que uma pequena parte da quantidade dos fotossensibilizadores ficou imobilizada no suporte polimérico. Estudos mostram que a retenção de fotossensibilizador em membranas poliméricas depende da concentração e estrutura química do fotossensibilizador adicionado às membranas e da natureza do polímero, colágeno ou quitosana (BONNETT et al, 2006; GUIBAL; ROUSSY, 2007; NORONHA, 2010).

Além disso, os resultados deste trabalho sugerem que para tratamento de água utilizando as membranas desenvolvidas, a liberação prévia do fotossensibilizador não imobilizado nas membranas de quitosana é um importante passo a ser realizado a fim garantir ausência do corante na água, visto que para tratamento de água, traços residuais de fotossensibilizador podem contaminar a água (BENNABOU ET AL, 2011).

5.6 Fotoinativação de *Escherichia coli* empregando fotossensibilizador incorporado em quitosana

Testes controles (membranas de quitosana/fotossensibilizador no escuro e membranas de quitosana irradiadas) foram realizados para investigar a existência de citotoxicidade das membranas de quitosana sem fotossensibilizador na presença e ausência de irradiação.

5.6.1 Azul de metileno

As membranas de quitosana contendo AM incorporado foram irradiadas em 630 ± 30 nm (LED vermelho) em virtude de este corante exibir intensa absorção nessa região do espectro eletromagnético (ver Figura 13). Nos ensaios controle, bem como naqueles utilizando membranas de quitosana/AM não foram observadas morte celular (Figura 17). Em contraste, resultados de fotoinativação encontrados na literatura mostram que AM em solução ($3,65 \mu\text{mol L}^{-1}$) reduz significativamente o número de células de *E. coli* (ERGAIEG; SEUX, 2009; JEMLI et al, 2002). Os resultados obtidos indicam que membranas de quitosana contendo AM incorporado ($5,00 \pm 0,10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AM por grama de membrana de quitosana) irradiadas no vermelho não produziram fotoinativação efetiva da bactéria *E. coli*. Isso pode ser devido à formação de agregados de AM nas membranas de quitosana e à taxa de produção de oxigênio singlete de fotossensibilizadores imobilizados em suporte polimérico ser cerca de cem vezes menor do que a dos fotossensibilizadores em solução (NAWAKOWSKA; KEPCYNSKI, 1998; SCHAAPS et al, 1975)

Figura 17: Fotoinativação da *Escherichia coli* em suspensão bacteriana utilizando membranas de quitosana com AM incorporado sob irradiação com LED vermelho (—■—) e ensaios controle (—▲—membrana sem fotossensibilizador irradiada e —●— membrana com fotossensibilizador no escuro). Os pontos apresentados no gráfico referem-se à média de dois experimentos independentes.

5.6.2 Rosa de bengala

Os testes de fotoinativação empregando a RB incorporada nas membranas de quitosana foram realizados utilizando o LED amarelo como fonte de irradiação, devido a este corante exibir absorção intensa nessa região do espectro eletromagnético (ver Figura 14). Além disso, estas também foram submetidas a testes utilizando LED branco. Os resultados obtidos (LED amarelo e branco, Figura 18) não mostraram uma diminuição significativa das células bacterianas. Alguns resultados encontrados na literatura sugerem que RB em solução ($3,0 - 10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) é capaz de fotoinativar significativamente a bactéria *E. coli*. (ERGAIEG; SEUX, 2009; JEMLI et al, 2002; SCHÄFER et al, 2007). Isso indica que o processo de inativação fotodinâmica não foi efetivo quando foram empregadas membranas de quitosana contendo $3,50 \pm 0,30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de RB por grama de membrana de quitosana. Também nesse caso o resultado pode ser explicado pela menor produção de oxigênio singlete em fotossensibilizadores imobilizados do que em solução (NAWAKOWSKA; KEPCYNSKI, 1998; SCHAAPS et al, 1975).

Figura 18: Fotoinativação da *Escherichia coli* em suspensão bacteriana utilizando membranas de quitosana com RB incorporado sob irradiação com LED (A) amarelo (B) branco (—■—) e ensaios controle (—▲—membrana sem fotossensibilizador irradiada e —●—membrana com fotossensibilizador no escuro). Os pontos apresentados no gráfico referem-se à média de dois experimentos independentes.

5.6.3 5,10,15,20-tetrakis(p-aminofenil)-porfirina

Nos testes utilizando a membrana de quitosana/p-TAPP os sistemas de irradiação utilizados foram o LED azul e amarelo, em virtude de a porfirina possuir absorção em torno desses comprimentos de onda (ver Figura 15), bem como sobre o LED branco, com o intuito de abranger todo o espectro eletromagnético na região do visível.

Figura 19: Fotoinativação da *Escherichia coli* em suspensão bacteriana utilizando membranas de quitosana com p-TAPP incorporado sob irradiação com LED (A) amarelo (B) azul e (C) branco (—■—) e ensaios controle (—▲— membrana sem fotossensibilizador irradiada e —●— membrana com fotossensibilizador no escuro). Os pontos apresentados no gráfico referem-se à média de dois experimentos independentes.

Nos experimentos controle não foi observada morte celular (Figura 19). Empregando-se membranas de quitosana/p-TAPP observou-se em torno de 2 log de redução em 140 minutos de irradiação (LEDs amarelo ou azul) e 3 log de redução em 180 minutos de irradiação (LED branco). Esses resultados indicam que a porfirina incorporada em suporte polimérico produz efeito fotodinâmico sobre a *E. coli* e que o LED branco causou maior morte celular, provavelmente devido a este emitir luz na região de 400-700 nm abrangendo todas os máximos de absorção da porfirina. Resultados encontrados na literatura indicam redução celular significativa quando se utilizam membranas de quitosana/p-TAPP e suspensão bacteriana de concentração inicial $3,5 \times 10^3$ células mL^{-1} (BONNETT et al, 2006). Assim, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que membranas de quitosana contendo p-TAPP possuem atividade fotodinâmica mesmo quando se utiliza suspensão bacteriana muito mais concentrada.

5.6.4 Meso-tetrakis (4-N-metilpiridil)-porfirina

Nos experimentos utilizando membranas de quitosana/TMPyP no escuro e membranas de quitosana sem fotossensibilizador irradiadas com LED azul e amarelo e branco não foi observada morte celular, como mostrado na Figura 20. Ensaios de inativação bacteriana empregando membrana de quitosana/TMPyP sob irradiação com LED azul e amarelo mostraram 4 log de redução após 120 e 140 minutos, respectivamente. Ademais, observou-se também efeito bactericida (5 log de redução após 120 minutos) quando as membranas de quitosana/TMPyP foram irradiadas utilizando o LED branco.

Figura 20: Fotoinativação da *Escherichia coli* em suspensão bacteriana utilizando membranas de quitosana com TMPyP incorporado sob irradiação com LED (A) amarelo (B) azul e (C) branco (—■—) e ensaios controle (—▲— membrana sem fotossensibilizador irradiada e —●— membrana com fotossensibilizador no escuro). Os pontos apresentados no gráfico referem-se à média de dois experimentos independentes.

Os resultados sugerem que o processo de Inativação Fotodinâmica empregando TMPyP incorporada em fase heterogênea (membrana de quitosana) produz efeito quando se utiliza suspensão bacteriana de alta concentração inicial (1×10^7 - 1×10^9 células mL⁻¹), o que é considerada uma contaminação considerável. Deve-se destacar que estudos semelhantes na literatura com *E. coli* empregam concentração inicial 1×10^3 - 1×10^5 células mL⁻¹ (DOVIGO et al, 2010; NO et al, 2002; WAINWRIGHT, 2004). Além disso, na comparação dos resultados verifica-se que o LED azul causou a mesma redução celular (4 log) em menor tempo de irradiação (120 minutos), quando comparado com o LED amarelo. Como pode ser observado na Figura 16, o coeficiente de extinção molar da porfirina na região do azul é maior do que na região do amarelo, levando à maior absorção de energia luminosa o que leva a uma maior produção de espécies oxidativas, conferindo melhor atividade fotodinâmica à porfirina quando esta é irradiada na região do azul (SIMPLÍCIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002). Ademais, o sistema utilizando o LED branco foi o mais efetivo, causando maior inativação da bactéria *E. coli* (5 log de redução), utilizando maior concentração inicial de células (1×10^9). Isso pode ser devido ao LED branco abranger todos os máximos de absorção da porfirina (ver Figura 16).

A Tabela 1 compara os resultados obtidos para os quatro corantes utilizados. Verifica-se que a quantidade de fotossensibilizador que permaneceu incorporado no suporte polimérico não é um fator restritivo para o processo fotoquímico, uma vez que a porfirina p-TAPP (incorporada em menor concentração, ou seja, $1,00 \pm 0,10$ µmol L⁻¹ de p-TAPP por grama de membrana de quitosana), produz efeito fotodinâmico, enquanto o AM, incorporado na concentração de $5,00 \pm 0,10$ µmol L⁻¹ por grama de quitosana não foi capaz de inativar a bactéria empregada. Além disso, observa-se que a carga iônica da molécula e o rendimento quântico de oxigênio singlete são fatores que associados colaboram para a fotoinativação da bactéria *E. coli*. Por exemplo, a TMPyP (tetra-catiônica), possuindo rendimento quântico ligeiramente menor que o RB (di-aniônico), mostrou maior atividade fotodinâmica sobre a bactéria Gram-negativa empregada (Tabela 1). Resultados encontrados na literatura, utilizando fotossensibilizador em solução (ERGAIEG; SEUX, 20007) corroboram com os obtidos neste trabalho, os quais sugerem que a fotoinativação depende do tipo de microrganismo, bem como do fotossensibilizador (concentração, rendimento quântico de oxigênio singlete, carga iônica).

Tabela 1

Resumo dos resultados obtidos e propriedades dos fotossensibilizadores

Fotossensibilizador	TMPyP	p-TAPP	RB	AM
Concentração de fotossensibilizador imobilizado ($\mu\text{mol L}^{-1}$) por grama de membrana de quitosana	$2,00 \pm 0,04$	$1,00 \pm 0,10$	$3,50 \pm 0,30$	$5,00 \pm 0,10$
Produz efeito fotodinâmico	Sim	Sim	Não	Não
Carga iônica	4+	0	2-	1+
Rendimento quântico de oxigênio singlete	0,74 ^a	0,53 ^b	0,76 ^c	0,39 ^d

a. Fonte: REDDI et al, 2002

b. Fonte: BHAUMIK; WEISSLEDER; MCCARTHY, 2009

c. Fonte: LEE; RODGERS, 1987

d. Fonte : BLUM; GROSSWEINER, 1985

Ademais, resultados encontrados na literatura (ZHENG; ZHU, 2003) sugerem que gel de 1 % de quitosana de massa molar igual ou inferior a $0,5 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ causaram inibição de *E. coli* e que o efeito antimicrobiano deste polímero contra bactérias Gram-negativas foi devido à facilidade da difusão da quitosana de baixa massa molar na célula microbiana, o que perturba o metabolismo da célula. Assim, os resultados obtidos nos ensaios controle utilizando membranas de quitosana sem corante eram esperados, uma vez que a quitosana empregada nos experimentos estava na forma de membranas - o que impossibilita a infiltração desta na célula – não acarretando morte celular da bactéria Gram-negativa *E. coli*.

5.7 Determinação da atividade fotodinâmica dos fotossensibilizadores

Em virtude das porfirinas terem apresentado efeito fotodinâmico, quando imobilizadas em suporte polimérico, estas foram selecionadas para os testes de determinação da atividade fotodinâmica. Assim, a atividade fotodinâmica foi determinada para a p-TAPP e TMPyP em solução, através do método do ácido úrico. O teste do AU utiliza a diminuição da absorbância em 293 nm, após a irradiação de uma solução contendo AU e fotossensibilizador, como uma avaliação rápida das atividades relativas fotodinâmica do fotossensibilizador (FISCHER et al, 1998).

Para o teste do AU, foi utilizada AU na concentração $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ para minimizar os erros devido à baixa concentração de AU ($0\text{-}20 \mu\text{g mL}^{-1}$) devido à preparação da solução e erros devidos a alta concentração de AU ($35\text{-}50 \mu\text{g mL}^{-1}$) devido aos efeitos de saturação em solução. O tempo de irradiação foi de 300 segundos, assumindo um comportamento linear entre o decréscimo de absorbância do AU e o tempo de irradiação (FISCHER et al, 1998). Com o intuito de comparar os resultados obtidos para os dois fotossensibilizadores, ambos foram preparados na concentração $2,7 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A Figura 21 mostra o espectro de absorção da solução de AU/porfirina obtido antes e após irradiação com o LED azul (140 W m^{-2}), região de região de maior absorção das porfirinas (ver Figura 15 e 16).

Figura 21: Espectro de absorbância da solução de AU contendo (A) p-TAPP e (B) TMPyP antes (—) e após irradiação (—) com LED azul. A concentração do AU era $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ e das porfirinas $2,7 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções foram feitas em tampão fosfato, pH 7,4.

A partir dos espectros de absorção a atividade fotodinâmica (PA) foi determinada. Para TMPyP e p-TAPP, quando irradiadas por 300 segundos com LED azul, sendo $5,38 \pm 0,78$ e $8,08 \pm 1,17 \text{ m}^2 \text{ J}^{-1}$, respectivamente. A atividade fotodinâmica das porfirinas obtida refere-se à média de três experimentos independentes. Analisando estes resultados isoladamente, verifica-se que a p-TAPP apresenta maior atividade, quando comparada com a TMPyP, ou seja, p-TAPP tem maior produção de oxigênio singlete. Entretanto, os resultados de fotoinativação de *E. coli* em solução obtidos para membranas de quitosana/TMPyP indicam que o sistema utilizando esta porfirina foi mais efetivo. Assim, os resultados da atividade fotodinâmica obtidos estão em concordância com os discutidos anteriormente, os quais sugerem que o processo de inativação fotodinâmica empregando fotossensibilizador

imobilizado em suporte polimérico dependem da quantidade de corante incorporado, carga iônica bem como das propriedades fotofísicas dos fotossensibilizadores.

Estes experimentos nos permitiram selecionar a TMPyP para as próximas fases do trabalho.

5.8 Fotoinativação de *Escherichia coli* empregando TMPyP em solução

Estes ensaios foram realizados com o objetivo de investigar a ação fototóxica da TMPyP em solução empregando a mesma concentração de corante que permaneceu incorporada no suporte polimérico ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$). Controles foram efetuados para investigar a existência de citotoxicidade dos LEDs bem como do fotossensibilizador no escuro. Os resultados (Figura 22) mostram que as fontes de luz não possuem ação contra a *E. coli*. No entanto, observou-se que a TMPyP, nesta concentração, possui efeito citotóxico contra esta bactéria sob irradiação com LED azul e amarelo bem como no escuro. Isso indica que esta porfirina é tóxica às células bacterianas na concentração de $2 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 22: Fotoinativação da *Escherichia coli* em suspensão bacteriana utilizando solução de TMPyP $2 \mu\text{M}$ em DMSO sob irradiação com LED (A) azul e (B) amarelo (—■—) e ensaios controle (—▲— sem fotossensibilizador irradiado e —●— com fotossensibilizador no escuro). Os pontos apresentados no gráfico referem-se à média de dois experimentos independentes.

Comparando-se os resultados obtidos utilizando a TMPyP em solução e imobilizado em quitosana observou-se que o suporte polimérico impede a ação citotóxica da porfirina na concentração de $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ e garante que a inativação microbiana ocorra apenas quando há

irradiação com luz, ou seja, a fotoinativação. Resultados na literatura (NAWAKOWSKA; KEPCYNSKI, 1998; SCHAAPS et al, 1975) sugerem que fotossensibilizador livre em solução possui taxa de produção de oxigênio singlete maior que os imobilizados em suporte polimérico, devido provavelmente a problemas de difusão.

5.9 Fotoinativação de *Escherichia coli* empregando sistema circulatório de água

Com o intuito de simular uma situação real de fotoinativação da bactéria *E. coli* presente em água de abastecimento foi desenvolvido um sistema circulatório de água iluminado por LEDs brancos (fotoreator, Figura 23). Com este objetivo, membranas de quitosana/TMPyP reforçadas com nylon foram empregadas. Experimentos controles foram realizados utilizando membranas de quitosana sem fotossensibilizador reforçadas com nylon irradiadas e membranas quitosana/TMPyP reforçadas com nylon no escuro.

Figura 23: Sistema circulatório de água irradiado por LEDs brancos

Os resultados mostram que não ocorreu morte celular significativa nos experimentos controle-(Figura 24). Em contraste, observa-se em torno de 3 log de redução de *E. coli* em 80 minutos de irradiação nos experimentos utilizando membranas reforçadas de quitosana/TMPyP. Resultados encontrados na literatura (BONNETT et al, 2006) obtiveram em torno de 2 log de redução em ensaios de fotoinativação empregando sistema circulatório

de água e membranas de quitosana/p-TAPP. Portanto, pode-se considerar o presente resultado como bastante satisfatório.

Figura 24: Fotoinativação da *Escherichia coli* utilizando fotoreator empregando membranas de quitosana contendo TMPyP e reforçadas com nylon (—■—) e ensaios controle (—▲— sem fotossensibilizador irradiada e —●— com fotossensibilizador no escuro).

O modelo de sistema circulatório empregado mostra que o conceito de fotoinativação utilizando fotossensibilizador imobilizado em fase heterogênea em sistema dinâmico é efetivo. Contudo, o processo do fotoreator precisa ser otimizado através da manipulação de parâmetros como: quantidade de fotossensibilizador imobilizado no suporte polimérico e/ou número de membranas utilizadas, concentração inicial de células bacterianas; potência da luz empregada e quantidade de oxigênio no meio.

6. CONCLUSÕES

O desenvolvimento de membranas de quitosana contendo fotossensibilizador incorporado e o possível emprego destas membranas para desinfetar a água com a presença da bactéria *Escherichia coli*, usada como microrganismo modelo, foi investigado. Os resultados da incorporação dos fotossensibilizadores nas membranas de quitosana mostram que apenas uma pequena parte da quantidade destes ficou imobilizada no suporte polimérico. Além disso, os resultados sugerem que para aplicação das membranas quitosana/fotossensibilizador desenvolvidas visando a desinfecção de água, onde traços residuais de corante são inaceitáveis, é importante previamente liberar o fotossensibilizador não imobilizado no suporte polimérico. Os resultados espectroscópicos das membranas de quitosana/fotossensibilizador indicam que os fotossensibilizadores, quando presentes, não levaram a mudanças na estrutura da quitosana e que este polímero não levou a mudanças nas propriedades ópticas dos corantes. No sistema estático, observou-se que processo de inativação fotodinâmica empregando fotossensibilizador incorporado em suporte polimérico da carga iônica e das propriedades espectroscópicas e fotofísicas do fotossensibilizador. O processo utilizando TMPyP incorporado em membrana de quitosana foi o mais eficaz para inativar a bactéria *E. coli* uma vez que se observou um significativo efeito bactericida: 5 log de redução após 120 minutos de irradiação com LED branco e 4 log de redução após 120 e 140 minutos de irradiação com LED azul e amarelo, respectivamente. No sistema dinâmico, empregando-se o sistema circulatório de água e membranas de quitosana/TMPyP reforçadas com nylon o processo de fotoinativação foi efetivo (3 log de redução em 80 minutos de irradiação). Portanto, os objetivos propostos neste trabalho foram cumpridos com êxito: os fotossensibilizadores foram imobilizados em membranas de quitosana e dentre os fotossensibilizadores estudados a porfirina TMPyP se mostrou mais efetiva para inativar fotodinamicamente a bactéria *E. coli* tanto em sistema estático quanto dinâmico. Até o presente momento não existe na literatura trabalhos utilizando TMPyP imobilizada em membranas de quitosana. O modelo proposto para o sistema dinâmico precisa ter seus parâmetros de fotoinativação otimizados, uma vez que a desinfecção da água usando fotossensibilizadores pode ter aplicações práticas importantes como a desinfecção de água em reservatórios de hospitais, consultórios odontológicos, creches e escolas e residências.

REFERÊNCIAS BIBLIORÁFICAS¹

ACHER, A.; FISCHER, E.; ZELLINGHER, R.; MANOR, Y. Photochemical disinfection of effluents-pilot plant studies. **Water Res.**, v.24, p.837-843, 1990.

ACHER, A.; FISCHER, E.; TURNHEIM, R.; MANOR, Y. Ecologically friendly wastewater disinfection techniques. **Wat. Res.**, v.31, p.1398-1404, 1997.

ALARCÓN, E.; EDWARDS, A.M.; ASPÉE, A.; BORSARELLIC, C.D.; LISSI, E.A. Photophysics and photochemistry of rose bengal bound to human serum albumin. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.8, p.933-943, 2009.

ALOUINI, Z.; JEMLI, M. Destruction of helminth eggs by photosensitized porphyrin. **J. Environ. Monit.**, v.3, p.548-551, 2001.

ALVES, E.; COSTA, L.; CARVALHO, C.M.B.; TOMÉ, J.P.C.; FAUSTINO, M.A.; NEVES, M.G.P.M.S. TOMÉ, A.C.; CAVALEIRO, J.A.S.; CUNHA, A.; ALMEIDA, A. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic *meso*-substituted porphyrins. **BMC Microbiology**, v.9, p.70-83, 2009.

ARROJADO, C.; PEREIRA, C.; TOMÉ, J.P.C.; FAUSTINO, M.A.F.; NEVES, M.G.P.M.S.; TOMÉ, A.C.; CAVALEIRO, J.A.S.; CUNHA, A.; CALADO, R.; GOMES, N.C.M.; ALMEIDA, A. Applicability of photodynamic antimicrobial chemotherapy as an alternative to inactive pathogenic bacteria in aquaculture systems. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.10, p.1691-1700, 2011.

ASSIS, O.B.G.; BRITTO, D. Processo básico de extração de quitinas e produção de quitosana a partir de resíduos da carnicultura. **R. Bras. Agrociência**, v.14; p.91-100, 2008.

BENABBOU, A.K.; GUILLARD, C.; PIGEOT-RÉMY, S.; CANTAU, C.; PIGOT, T.; LEJEUNE, P.; DERRICHE, Z.; LACOMBE, S. Water disinfection using photosensitizers supported on silica. **J. Photochem. Photobiol., A**, V.219, P.101-108, 2011.

BEPPU, M.M.; ARRUDA, E.J.; SANTANA, C.C. Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana. **Polímero: ciência e tecnologia**, p.163-169, 199.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas- NBR 6023

BHAUMIK, J.; WEISSLEDER, R.; MCCARTHY, J.R. Synthesis and photophysical properties of sulfonamidophenyl porphyrins as model for activatable photosensitizers. **J. Org. Chem.**, v.74, p.5894-5901, 2009.

BLUM, A.; GROSSWEINER, L.I. Singlet oxygen generation by hematoporphyrin IX, uroporphyrin I and hematoporphyrin derivate at 456 nm in phosphate buffer and in the presence of egg phosphatidyl-choline liposomes. **Photochem. Photobiol.**, v.41, p.27-32, 1985.

BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chem. Soc. Rev.**, v.19, p.19-33, 1995.

BONNETT, R.; EVANS, R.L.; GALIA, A.B.B. Immobilized photosensitizers: photosensitizers films with microbicidal effects. **Proc. Soc. Photo-opt. Instrum. Eng.**, v.3191, p.79-88, 1997.

BONNETT, R.; KRYSTEVA, M.A.; LALOV, I.G.; ARTARSKY, S.V. Water disinfection using photosensitizers immobilized on chitosan. **Water Res.**, v.40, p.1269-1275, 2006.

BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F.M.; ARGÜELLES-MONAL, W.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M. An infrared investigation in reaction with chitin and chitosan characterization. **Polym.**, v.42, p.3569-3580, 2001

CAMINOS, D.A.; SPESIA, M.B.; DURANTINI, E.N. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by novel meso- substituted porphyrins by 4-(3-N,N,N-trimethylammoniumpropoxy)phenyl and 4-(trifluoromethyl)phenyl groups. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.5, p.56-65, 2006.

CAMPANA-FILHO, S.P.; BRITTO, D.; ELISABETE, C.; ABREU, F.R.; CARDOSO, M.B.; BATTISTI, M.V.; SIM, P.C.; GOY, R.C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R.L. Extração, estruturas e propriedades de α e β quitina. **Quim. Nova.**, v.30, p.644-650, 2007.

CARVALHO, C.M.B.; GOMES, A.T.P.C.; FERNANDES, S.C.D.; PRATA, A.C.B.; ALMEIDA, M.A.; CUNHA, M.A.; TOMÉ, J.P.C.; FAUSTINO, M.A.F.; NEVES, C.G.P.M.S.; TOMÉ, A.C.; CAVALEIRO, J.A.S.; LIN, Z.; RAINHO, J.P.; ROCHA, J. Photoinactivation of bacteria in wastewater by porphyrins: bacterial β -galactosidase activity and leucine-uptake as methods to monitor the process. **J. Photochem. Photobiol. B**, v.88, p.112-118, 2007.

CHEN, R.H.; HWA, H.D. Effect of molecular weight of chitosan the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical, and permeability properties of the prepared membrane. **Carbohydr. Polym.**, v.29, p.353-358, 1996.

CHEN, H.D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unraveling pathogenesis. **FEMS Microbial Rev.**, v.29, p.83-98, 2005.

COSTA, L.; ALVES, E.; CARVALHO, C.M.B.; TOMÉ, J.P.C.; FAUSTINO, A.F.; NEVES, M.G.P.S.; TOMÉ, A.C.; CAVALEIRO, J.A.S.; CUNHA, A.; ALMEIDA, A. Sewage bacteriophage photoinactivation by cationic porphyrins: a study of charge effect. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 7, p.415-422, 2008.

COOPER, A.T.; GOSWAMI, D.Y. Evaluation of methylene blue and rose bengal for dye sensitized solar water treatment. **J. Sol. Energy Eng.**, v.124, p. 305-309, 2002.

DABROWSKA, A.; NAWROCKI, J. Controversies about the occurrence of chloral hydrate in drinking water. **Water Res.**, v.43, p.2201-2208, 2009.

DAHL, T.A.; MIDDEN, W.R.; HARTMAN, P.E. Pure singlet oxygen cytotoxicity for bacteria. **Photochem. Photobiol.**, v.46, p.345-352, 1987.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R.M.; CHIELLINI, E. Chitosan- a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Prog. Polym. Sci.**, v. 36, p.981-1014, 2011.

DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Effect of cell-photo sensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, n. 6, p. 2329-2335, 2005.

DEROSA, M.C.; CRUTCHLEY, R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coord. Chem. Rev.**, v.233, p.351-371, 2002.

DOMINGUES, V.O.; TAVARES, G.D.; STÜKER, F.; MICHELOT, T.M.; REETZ, L.G.B.; BERTONCHELI, C.M.; HÖRNER, R. Contagem de bactérias heterotróficas na água para consumo humano: comparação entre duas metodologias. **Saúde**, v.33, p.15-19, 2007.

DOVIGO, L.N.; PAVARINA, A.C.; RIBEIRO, D.G.; ADRIANO, C.S.; BAGNATON V.S. Photodynamic inactivation of four candida species induced by photogem. **Brazilian J. Microbil.**, v.41, p.42-49, 2010

DU, P.; LI, P.; LI, Y.-M.; WEI, Q.; TIAN, L.-H. A pH- sensitive chitosan- tripolyphosphate hydrogel beads for controlled clipizide delivery. **J. Biomed. Mater. Res., Part B**, v.97B, p.175-183, 2011.

DUTTA, P.K.; DUTTA, J.; TRIPATHI, V.S. Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. **J. Sci. Ind. Res.**, v.63, p. 20-31, 2004.

ERGAIEG, K.; CHEVANNE, M; CILLARD, J; SEUX, R. Involvement of both Type I and Type II mechanisms in Gram-positive and Gram-negative bacteria photosensitization by a *meso*-substituted cationic porphyrin. **Sol. Energy**, v.82, p.1107-1117, 2008.

ERGAIEG, K.; SEUX, R. A comparative study of the photoinactivation of bacteria by *meso*-substituted cationic porphyrin, rose bengal and methylene blue. **Desalination**, v.246, p.353-362, 2009.

FAUST, D.; FUNKEN, K.H.; HORNEK, G.; MILOW, B.; ORTNER, J.; SSTLEGGGER, M.; SCHÄFER, M.; SCHMITZ, C. Immobilized Photosensitizers for Solar Photochemical Applications. **Sol. Energy**, v.65, p.71-74, 1999.

FISCHER, F.; GRASCHEW, G.; SINN, H.-J.; MAIER-BORST, W.; LORENZ, W.J.; SCHLAG, P.M. A chemical dosimeter for the determination of the photodynamic activity of photosensitizers. **Clin. Chim. Act.**, v.274, p.89-104, 1998.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN, V.F. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. **Infect. Immun.**, v.73, p.2573-2585, 2005.

GERBA, C.P.; WALLIS, C.; MELNICK, J.L. Disinfection of wastewater by photodynamic oxidation. **J. Water Poll. Control. Fed.**, v.49, p.575-583, 1977.

GUIBAL, E.; ROUSSY, J. Coagulation and flocculation of dye- containing solutions using a biopolymer (chitosan). **React. Funct. Polym.**, v.67, p.33-42, 2007.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem. Photobiol. Sci.*, v 3, p.436-450, 2004.

JEMLI, M.; ALOUINI, Z.; SABBAHI, S.; GUEDDARI, M. Destruction of fecal bacteria in wastewater by three photosensitizers. **J. Environ. Monit.**, v.4, p.511-516, 2002.

JOSUÉ, A.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V.; KIMURA, I. Y. Liberação controlada de eosina impregnada em microesfera de copolímero de quitosana e poli (ácido acrílico). **Polímeros**, v.03, p.116-121, 2000.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.J. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.2, p.123-140, 2004.

KULSHRESHTHA, S.N. A Global Outlook for Water Resources to the Year 2025. **Water Resour. Manag.**, v.12, p.167-184, 1998.

KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. **React. Funct. Polym.**, v.46, p. 1-27, 2000.

KUZNETSOVA, N.A.; MAKAROV, D.A.; KALIYA, O.L.; VOROZHTSOV, G.N. Photosensitized oxidation by dioxygen as the base for drinking water disinfection. **J. Hazard. Mater.**, v.146, p.487-491, 2007.

LAMBRECHTS, S.A.G.; AALDERS, M.C.G; MARLE, J.V. Mechanistic Study of the Photodynamic Inactivation of *Candida albicans* by a Cationic Porphyrin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.49, p.2026-2034, 2005.

LEE, P.C.; RODGERS, M.A. Laser flash photokinetic studies of rose bengal sensitized photodynamic interactions of nucleotide and DNA. **Photochem. Photobiol.**, v.45, p.79-86, 1987

MACHADO, A. E. H. Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quim. Nova**, v.23, p.237, 2000.

MAISCH, T. Anti- microbial photodynamic therapy: useful in the future? **Laser Med. Sci.**, v.22, p.83-91, 2007.

MAISCH, T.; BAIER, J.; FRANZ, B.; MAIER, M.; LAHDTHALER, M.; SZEIMIES, R. –M.; BÄUMLE, W. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. **PNAS.**, v.104, p.7223-7228, 2007.

MAISCH, T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. **Mini Rev. Med. Chem.**, v.9, p.947-983, 2009.

MANJÓN, f.; SANTANA-MAGAÑA, M.; GARCÍA-FRESNADILLO, D.; ORELLANA, G. Singlet oxygen sensitizing materials based on porous silicone: photochemical characterization, effect of dye reloading and application to water disinfection with solar reactors. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.9, p.838-845, 2010.

McDANIEL, T.K.; JARVIS, K.G.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.1664-1668, 1995.

MERCHAT, M.; BERTOLINI, G.; GIACOMINI, P.; VILLANEUVA, A.; JORI, G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of Gram-positive and Gram-negative bacteria. **J. Photochem. Photobiol., B**, v.32, p.153-157, 1996.

MI, F.L.; SUNG, H.W.; SHYU, S.S.; SU, C.C.; PENG, C.K. Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co-crosslinked chitosan gel beads. **Polymer**, v.44, p.6521-6530, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 518, de 25 de Março de 2004. Normas e padrão da potabilidade da água destinada ao consumo humano. Brasília (DF); 2004;

MINNOCK, A.; VERNON, D.I.; SCHOFIELD, J.; GRIFFITHS, J.; PARISH, J.H.; BROWN, S.B. Use of cationic water soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. **J. Photochem. Photobiol., B**, v.32, p.159-164, 1996.

MOURA, C.; MUSZINSKI, P.; SCHMIDT, C.; ALMEIDA, J.; PINTO, L. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto. **Vetor**, v.16, p.37-45, 2006.

MOXLEY, R.A.; SMITH, D.R. Attaching-effacing *Escherichia coli* infections in cattle. **Vet. Clin. Food Anim.**, v.26, p.29-56, 2010.

NATARO, J.P.; STEINER, T.; GUERRANT, R.L. Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v.4, p.251-261, 1998.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.11, p.142-201, 1998.

NO, H.K.; PARK, N.Y.; LEE, S.H.; MEYERS, S.P. Antibacterial activity of chitosan oligomers with molecular weights. **Int. J. Food Microbiol.**, v.74, p.65-72, 2002.

NORONHA, A.Z.T. Desenvolvimento de membrana muco-adesiva à base de colágeno para liberação de fotossensibilizadores na fotoinativação da *Candida albicans*. 2010. 98f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

NOWAKOWSKA, M.; KEPCYNSKI, M. Polymeric photosensitizers 2. Photosensitized oxidation of phenol in aqueous solution. **J. Photochem. Photobiol. A: Chem.**, v.116, p. 251-256, 1998.

PERUSSI, J.R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Quim. Nova**, v.30, p.988-994, 2007.

RABEA, E.I.; MOHAMED, B.E.-T.; STEVENS, C.V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v.4, p.1457-1465, 2003.

REDDI, E.; CECCON, M.; VALDUGA, G.; JORI, G.; BOMMER, J.C.; ELISEI, F.; LATTERINI, L.; MAZZUCATO, U. Photophysical properties and antibacterial activity of *meso*- substituted cationic porphyrins. **Photochem. Photobiol.**, v.75, p.462-470, 2002

REDMOND, R.W.; GAMLIN, J.N. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. **Photochem. Photobiol.**, v.70, p.391-495, 1999.

RICHARDSON, S.D. Disinfection by-products and other emerging contaminants in drinking water. **Trends. Anal. Chem.**, v.22, p.666-684, 2003.

RICHARDSON, S.D. Water analysis: emerging contaminants and current issues. **Anal. Chem.**, v.79, p. 4295-4324, 2007.

RIBEIRO, J.N.; JORGE, R.A.; SILVA, A.R.; FLORES, A.V.; RONCHI, L.M.; TEDESCO, A.C. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. **Ecl. Quím**, v. 32, p. 7-14, 2007.

RICHARDSON, S.D.; PLEWA, M.J.; WAGNER, E.D.; SCHOENY, R.; DeMARINI, D.M. Occurrence, genotoxicity and carcinogenicity of emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. **Mutat. Res.**, v. 636, p. 178-242, 2007.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Prog. Polym. Sci.**, v.31, p.603-632, 2006.

RONCHI, L.M.; RIBEIRO, A.V.F.N.; SILVA, A.R.; SENA, G.L.; JORGE, R.N.; RIBEIRO, J.N. Influência da agregação e do fotobranqueamento na atividade fotodinâmica de protoporfirina de magnésio. **RECITEC**, v. 2, p. 5-12, 2007.

SABRÁ, A. ECEP, ECET, ECEA, ECEH, ECEI, ECAD: a *E. coli* revisitada no contexto da diarreia aguda. **J. Peditr.**, v.77, p.5-7, 2002.

SALMON-DIVON, M.; NITZAN, Y.; MALIK, Z. Mechanistic aspects of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by cationic tetra-*meso*-(*N*-methylpyridyl)porphine. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.3, p.423-439, 2004.

SANTOS, J.E.; SOARES, J.P.; DOCKAL, E.R.; CAMPANA-FILHO, S.P; CAVALHEIRO, E.T.G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciênc. Tecnol.**, v.13, p.242-249, 2003.

SAVINO, A.; ANGELI, G. Photodynamic inactivation of *E. coli* by immobilized or coated dyes on insoluble supports. **Water Res.**, v.19, p.1465-1469, 1985.

SCHAAP, A.P.; THAYER, A.L.; BLOSSEY, E.C.; NECKERS, D.C. Polymer- based sensitizers for photooxidations. II. **J. Am. Chem. Soc.**, v.97, p.3741-3745, 1975.

SCHÄFER, M.; SCHMITZ, C.; FACIUS, R.; HORNECK, G.; MILOW, B.; FUNKEN, K. –H.; ORTENER, J. Systematic study of parameters influencing the action of rose bengal with visible light on bacterial cells: comparison between the biological effect and singlet-oxygen production. **Photochem. Photobiol.**, v.71, p.514-523, 2000

SEVERINO, D.; JUNQUEIRA, H.C.; GUGLIOTTI, M.; GABRIELLI, D.S.; BAPTISTA, M.S. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. **Photochem. Photobiol.**, v.77, p.459-468, 2003.

SIITONEN, A. *Escherichia coli* in fecal flora of healthy adults serotypes P and type IC fimbriac, non-P mannose-resistant adhesion and hemolytic activity. **J. Infect. Dis.**, v,116, p.1058-1065, 1992.

SILVA, G. L. Estudo da ação inibitória da quitosana sobre os enteropatogenos: *Salmonella entérica*, *Shigella sonnei* e *Escherichia coli* EPEC. 2005. 100f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia). Programa de Pós-graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

SIMPLÍCIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Quim. Nova**, v.25, p.801, 2002.

SHIGEMASA, Y.; MATSUURA, H.; SASHIWA, H. SAIMOTO, H. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.18, p.237, 1996

SZEWZYK, U.; SZEWZYK, R.; MANZ, W.; SCHLEIFER, K. H. Microbiological safety on drinking water. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.54, p. 81-127, 2000

TAILOR, C.S.; NOURI, A.; LEE, C.G.; KOZAK, C.; KABAT, D. Cloning and characterization of a cell surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96, p.927-932, 1999.

TAN, S.C.; TAN, T.K.; WONG, S.M.; KHOR, E. The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time. **Carbohydr. Polym.**, v.30, p.239-242, 1996.

TANG, H.M.; HAMBLIN, M.R.; YOW, C.M.N. A comparative in vitro photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogens. **J. Infect. Chemother.**, v.13, p.87-91, 2007.

TARDIVO, J.P.; GIGLIO, A.D.; OLIVEIRA, C.S. et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v.2, p.175-191, 2005.

TIRKISTANI, F. A. A. Thermal analysis of some chitosan schiff bases. **Polym. Degrad Stab.**, v.60, p.67-70, 1998.

TODOROVA, N.; KRYSTEVA, M.; MANEVA, K.; TODOROV, D. Carminomycin-chitosan: a conjugated antitumor antibiotic. **J. Bioact. Compat. Polym.**, v.14, p.178–184, 1999.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia, 4^o Ed. Atheneu, São Paulo, 2004.

TSAI, G.J.; SU, W.H. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. **J. Food. Prot.**, v.62, p.239-243, 1999.

TSENG, S.C.G.; FEENDTRA, R.P.G.; WATSON, B.D. Characterization of photodynamic action of rose bengal on culture cell. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.35, p.3295-3307, 1994.

VILLANUEVA, A. The cationic *meso*-substituted porphyrins: an interesting group of photosensitizers, **J. Photochem. Photobiol. B**, v.18, p.295-298, 1993.

WAINWRIGHT, M. Pathogen inactivation in blood products. **Curr. Med. Chem.**, v. 9, p.127-143, 2002.

WAINWRIGHT, M. Photoinactivation of viruses. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.3, p.406-4011, 2004.

WOLFE, R. L. Ultraviolet disinfection of potable water. **Environ Sci. Technol.**, v.24, 768- 773, 1990.

WRIGHT, A.; BUBB, W.A.; HAWKINS, C.L.; DAVIES, M.J. Singlet oxygen mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues. **Photochem. Photobiol.**, v.66, p.35-46, 2002.

XU, Y. X.; KIM, K. M.; HANNA, M. A.; NAG, D. Chitosan starch composite film: preparation and characterization. **Ind. Crops Prod.**, v.21, p.185-195, 2005.

ZHENG, L.Y.; ZHU, J.F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydr. Polym.**, v.54, p.527-530, 2003.

APÊNDICE A - Curvas padrão de absorbância em função da concentração dos fotossensibilizadores

As figuras abaixo apresentam as curvas padrão de absorbância em função da concentração dos fotossensibilizadores em ácido acético 1%.

Figura A1: Curva padrão de absorbância do AM em ácido acético 1% em função da concentração, obtida em 600 nm.

Figura A2: Curva padrão de absorbância do RB em ácido acético 1% em função da concentração, obtida em 565 nm.

Figura A3: Curva padrão de absorvância do p-TAPP em ácido acético 1% em função da concentração, obtida em 416 nm.

Figura A4: Curva padrão de absorvância do TMPyP em ácido acético 1% em função da concentração, obtida em 425 nm.

APÊNDICE B – Determinação da quantidade de fotossensibilizador imobilizados nas membranas de quitosana

Após o processo de liberação do fotossensibilizador não imobilizado no suporte polimérico ter sido feito, amostras das membranas de quitosana foram dissolvidas em um volume conhecido de ácido acético 1%. A partir dessas soluções, espectros de absorção dos fotossensibilizadores imobilizados nas membranas de quitosana foram obtidos (ver Figuras 13-16) bem como a absorbância nos máximos de absorção de cada fotossensibilizador (ver Tabela B1). Os dados empregados para a determinação da quantidade de fotossensibilizador imobilizado no suporte polimérico estão apresentados na Tabela B1 e referem-se a três experimentos independentes.

Tabela B1

Dados utilizados para determinação da concentração de fotossensibilizador imobilizado nas membranas de quitosana.

Fotossensibilizador	Massa da membrana dissolvida (g)	Volume de ácido acético 1% (L)	Absorbância
AM	0,0021	10×10^{-3}	0,02807
	0,0026	10×10^{-3}	0,03310
	0,0027	10×10^{-3}	0,03408
RB	0,0288	5×10^{-3}	0,05600
	0,0385	5×10^{-3}	0,07600
	0,0394	5×10^{-3}	0,07301
p-TAPP	0,0368	5×10^{-3}	0,63005
	0,0811	5×10^{-3}	1,07711
	0,0329	5×10^{-3}	0,63301
TMPyP	0,0420	10×10^{-3}	0,32701
	0,0391	10×10^{-3}	0,31474
	0,0430	10×10^{-3}	0,34001

Assim, a quantidade de fotossensibilizador imobilizado nas membranas de quitosana foi determinada, como no Exemplo B1, por interpolação em curva de calibração anteriormente apresentada no Apêndice A. Os dados da concentração de corante imobilizado no suporte poliméricos obtidos estão dispostos na Tabela B2 e referem-se à média de três experimentos independentes.

Exemplo B1:

Para se determinar a quantidade de AM imobilizado no suporte polimérico, utiliza-se a equação da reta obtida na curva de calibração deste fotossensibilizador e fez-se os cálculos a seguir:

$$Absorbância = 0,00684 + 5,50571 Concentração (mg L^{-1}) \quad \text{Equação B1}$$

Portanto,

$$Concentração (mg L^{-1}) = \frac{Absorbância - 0,00684}{5,50571} \quad \text{Equação B2}$$

Como as amostras das membranas de quitosana contendo o fotossensibilizador foram dissolvidas em volume conhecido de ácido acético 1%, tem-se que:

$$FS_{imobilizado} (massa / massa) = Concentração (mg L^{-1}) * \frac{V(L)}{m(g)} \quad \text{Equação B3}$$

Sendo: $FS_{imobilizado}$ a massa de fotossensibilizador imobilizado (mg) por grama de suporte polimérico, V o volume de ácido acético (1%) utilizado para dissolver a membrana de quitosana e m a massa da amostra da membrana de quitosana.

Tabela B2

Quantidade dos fotossensibilizadores imobilizados nas membranas de quitosana (com desvio padrão). Os dados apresentados referem-se à média de três experimentos independentes.

Fotossensibilizador	Fotossensibilizador imobilizado^a (mg/g)	Concentração imobilizada^b ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
AM	$0,01830 \pm 0,00003$	$5,00 \pm 0,10$
RB	$0,01700 \pm 0,00100$	$3,50 \pm 0,30$
p-TAPP	$0,00730 \pm 0,00060$	$1,00 \pm 0,10$
TMPyP	$0,02700 \pm 0,00100$	$2,00 \pm 0,04$

a. Fotossensibilizador imobilizado refere-se a massa de fotossensibilizador imobilizado (mg) por grama de suporte polimérico

b. Concentração imobilizada refere-se a concentração de fotossensibilizador imobilizada em 1,0 g de membrana de quitosana