

CAROLINA DOS ANJOS

Luz azul antimicrobiana: alvos bacterianos e mecanismo de ação

São Paulo

2021

CAROLINA DOS ANJOS

Luz azul antimicrobiana: alvos bacterianos e mecanismo de ação

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Fabio Celidonio Pogliani

Coorientador:

Prof. Dr. Fábio Parra Sella

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

| | |
|-----------------|---|
| T. 4112 FMVZ | Anjos, Carolina dos Luz azul antimicrobiana: alvos bacterianos e mecanismo de ação / Carolina dos Anjos. – 2021. 80 f. : il. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2021. Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária. Área de concentração: Clínica Veterinária. Orientador: Prof. Dr. Fabio Celidonio Pogliani. Coorientador: Prof. Dr. Fabio Parra Sellera. 1. Alternativa antimicrobiana. 2. Fotoinativação. 3. Fotossensibilizador endógenos. 4. Mecanismo antimicrobianos. 5. Porfirinas. I. Título. |
|-----------------|---|

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Comissão de Ética no Uso de Animais



FMVZ USP

CERTIFICADO

CEUA/FMVZ Nº 1299131216

Título da proposta: "Luz azul antimicrobiana: alvos bacterianos e mecanismo de ação".

Responsável: Fábio Celidônio Pogliani
Equipe: Carolina dos Anjos

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e APROVOU, no dia 24/8/2021, a alteração do título da proposta acima referenciada.

Título anterior: "Fotoinativação bacteriana de patógenos da mastite por meio da luz: mecanismos de ação e segurança celular - Estudo pré-clínico"

São Paulo, 30 de agosto de 2021.

Marcelo Bahia Labruna
Coordenador

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ANJOS, Carolina dos

Título: **Luz azul antimicrobiana:** alvos bacterianos e mecanismo de ação

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe, **Cristina**, *in memoriam*, que me acompanha onde quer que eu esteja.

Ao meu pai, **Roberto**, exemplo de homem trabalhador e honesto, meu herói.

À minha irmã, **Fernanda**, minha amiga, meu alicerce e minha maior incentivadora.

Aos sobrinhos, **Manuela** e **Daniel**, por toda a alegria que me dão, por todo amor que
tenho por vocês.

À minha avó **Zuleica**, minha tia **Lídia** e meu cunhado **Marcus**, por todo o carinho
que sempre tiveram por mim, sei que torceram muito por isso.

AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Fabio Pogliani**, agradeço por toda confiança, paciência e pelas palavras tranquilas que sempre me ajudaram. A sua generosidade me permitiu trilhar novos caminhos. Muito obrigada!

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Fabio Sellera**, agradeço pelos incentivos que me impulsionaram nos estudos da luz.

Ao meu “orientador extracurricular”, **Dr. Caetano Sabino**, agradeço por toda dedicação e apoio. Obrigada por me abrir portas que eu jamais imaginaria adentrar. A você minha eterna gratidão!

Ao time de especialistas e colaboradores que possibilitaram a realização desse estudo: **Profa. Dra. Martha Ribeiro, Prof. Dr. Maurício Baptista, Prof. Dr. Nilton Lincopan, Dra. Milena Dropa e Dr. Victor Arana-Chavez**. Muito obrigada!

Ao meu chefe e mentor, **Prof. Dr. Tianhong Dai**, pesquisador e profissional singular. Agradeço por todas as oportunidades oferecidas e por sua generosidade em compartilhar o seu conhecimento.

Ao meu colega de trabalho e pesquisa, **Dr. Leon Leanse**, agradeço imensamente por toda a receptividade em um dos momentos mais desafiadores da minha vida acadêmica. Obrigada por toda ajuda e incentivo.

Aos meus amigos e colegas de equipe **Ronaldo Gargano e Bruna Stanigher**, por todos os bons momentos, conhecimentos e boas risadas compartilhadas. Tenho muito orgulho de vocês!

Aos maravilhosos da Equipe Della Libera: **José Ferronato, Kamila Reis, Camila Baptista, Fernando Nogueira e Profa. Dra. Alice Della Libera**. Obrigada por sempre me receberem de portas abertas, braços estendidos e sorriso largo no rosto. Saudades imensas de rir alto com vocês nos corredores do VCM.

Aos **professores, funcionários e colegas pós-graduandos** do Departamento de Clínica Médica da FMVZ.

Aos meus antigos e eternos orientadores, **Profa. Dra. Erika Mello Peixoto e Prof. Dr. Geison Nogueira**. Vocês foram essenciais no caminho trilhado até aqui.

Ao meu amigo, confidente, terapeuta e correspondente da Europa, **Bruno Toledo**. Obrigada por me acompanhar e me apoiar todos os dias e em todas as minhas decisões. Mesmo separados pela distância de um oceano, nossa amizade e cumplicidade nos mantem sempre juntos.

Às minhas amigas **Fernanda, Taís, Layane, Bruna, e Mirian**, meus orgulhos! Obrigada por sempre se fazerem presentes em minha vida e por compartilharmos tantos momentos felizes!

Agradeço à **Minha Família**, por todo o amor incondicional que temos uns pelos outros. Vocês são os alicerces que me permitem edificar todas as minhas realizações. Agradeço a educação que me deram e o exemplo que são para mim.

Agradeço principalmente a Deus por ter permitido conhecer, conviver e aprender e com todos os supramencionados.

AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2016/25095-4) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

O presente trabalho também teve o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“Nossa maior fraqueza é a desistência.
O caminho mais certo para o sucesso é sempre tentar apenas uma
vez mais.”*

Thomas Alva Edison

RESUMO

ANJOS, C. dos. **Luz azul antimicrobiana: alvos bacterianos e mecanismo de ação**. 2021. 80 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

É crescente a preocupação a respeito do futuro de terapias antimicrobianas em meio a crise global dos antibióticos. Temerosos, autoridades globais alertam para a urgência no desenvolvimento de terapias antimicrobianas alternativas e/ou preservação de antimicrobianos atualmente disponíveis. Neste contexto, a luz azul antimicrobiana destaca-se como uma alternativa terapêutica promissora, devido à sua atividade antimicrobiana intrínseca, proporcionando eficácia e segurança no tratamento de infecções. No entanto os alvos celulares preferenciais de ação antimicrobiana ainda não são bem esclarecidos. Dessa forma, este estudo teve como objetivo testar hipóteses comuns relacionadas aos alvos biológicos de morte bacteriana induzida pela exposição a luz azul antimicrobiana ($\lambda = 410 \text{ nm}$). Para entender a diversidade de possíveis danos estruturais, três espécies bacterianas foram estudadas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Porfirinas endógenas foram quantificadas e danos em estruturas bacteriana como DNA e membrana foram avaliados. Alterações em biomoléculas como proteínas e lipídeos, além da produção de EROS após exposição por luz azul também foram mensurados. Os resultados demonstram que doses subletais de luz azul podem promover danos à membrana, sugerindo que este seja o alvo primário de ação antimicrobiana. A degradação em DNA foi evidenciada em *S. aureus* e *E. coli*, porém não foram identificados danos em *P. aeruginosa*, sugerindo particularidades entre diferentes espécies. Evidenciou-se que a concentração de porfirinas endógenas possa não refletir diretamente a susceptibilidade bacteriana a luz. Adicionalmente, constatou-se que danos oxidativos em proteínas bacterianas e lipídios ocorram apenas após altas doses de exposição radiante. Esses resultados confirmam alguns aspectos importantes a respeito dos mecanismos antimicrobianas da luz azul e fornecem informações fundamentais que possibilitarão otimizações e/ou futuras terapias combinadas.

Palavras-chave: alternativa antimicrobiana; fotoinativação; fotossensibilizador endógenos; mecanismo antimicrobianos; porfirinas.

ABSTRACT

ANJOS, C. dos. **Antimicrobial blue light: bacterial targets and mechanism of action**. 2021. 80 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021

There is growing concern about the future of antimicrobial therapies amid the global antibiotic crisis. Fearful, international authorities warn of the urgency of developing alternative antimicrobial therapies or preserving currently available antimicrobials. In this context, antimicrobial blue light stands out as a promising therapeutic alternative due to its intrinsic antimicrobial activity, providing efficacy and safety in treating infections. However, the cellular targets are not yet well understood. Thus, this study aimed to test common hypotheses related to biological targets of bacterial death induced by exposure to antimicrobial blue light ($\lambda = 410$ nm). This study investigated three bacterial species: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Endogenous porphyrins were quantified, and structural damage such as DNA and bacterial membrane were evaluated. Changes in biomolecules such as proteins and lipids and the production of EROS after exposure to blue light were also measured. The results show that sublethal doses of blue light may promote damage to the bacterial membrane, suggesting that this is the primary target of antimicrobial action. DNA degradation was evidenced in *S. aureus* and *E. coli*, but no damage was observed in *P. aeruginosa*, suggesting particularities between different species. Evidence showed that the concentration of endogenous porphyrins might not directly reflect bacterial susceptibility to blue light. Additionally, it found oxidative damage to bacterial proteins and lipids occurs only after high radiant exposure doses. These results confirm some crucial aspects regarding the antimicrobial mechanisms of blue light and provide essential information that will empower optimizations and future combined therapies.

Keywords: antimicrobial alternative; antimicrobial mechanism; endogenous photosensitizer; photoinactivation; porphyrins.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Faraó egípcio Akhenaton, sua esposa Nefertiti e três de suas filhas expondo-se aos raios curativos do sol | 20 |
| Figura 2 - Crianças sob tratamentos fototerápicos realizados em varandas | 22 |
| Figure 3 - Antes e depois do tratamento de lesões de lúpus vulgaris utilizando terapia de Niels Finsen..... | 23 |
| Figura 4 - Terapia utilizando aparelho de Finsen permitindo concentração dos raios solares..... | 23 |
| Figure 5 - Terapia utilizando luz elétrica com lâmpada de arco de carbono | 24 |
| Figure 6 - Anúncio do laboratório Schenley Inc., em 1944..... | 26 |
| Figure 7 - Desenho esquemático representando mecanismos hipotetizados para a atividade antimicrobiana promovida pela luz azul..... | 30 |
| Figura 8 - Fonte de luz utilizada no experimento | 34 |
| Figura 9 - Cinética de inativação de <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> em função do tempo de irradiação por luz azul antimicrobiana..... | 46 |
| Figura 10 - Imagens representativas de microscopia de transmissão eletrônica ilustrando danos morfológicos em <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> induzidos após exposição a doses de luz azul antimicrobiana calculadas para inativação de 90% (DL ₉₀) e 99.9% (DL _{99.9}) do inóculo testado..... | 49 |
| Figura 11 - Concentrações de porfirinas endógenas presentes em (a) <i>P. aeruginosa</i> , (b) <i>S. aureus</i> e (c) <i>E. coli</i> , quantificadas por cromatografia líquida de ultra eficiência | 50 |
| Figura 12 - Perfil de distribuição espacial de moléculas endógenas fluorescentes em <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i> avaliadas por microscopia confocal de imageamento de tempo de vida de fluorescência..... | 51 |
| Figura 13 - Produção de espécies reativas de oxigênio intracelular em <i>P. aeruginosa</i> (a), <i>S. aureus</i> (b) e <i>E. coli</i> (c) após exposição à luz azul antimicrobiana mensurada pelo marcador 2', 7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) | 52 |
| Figura 14 - Efeitos supressores de espécies reativas de oxigênio produzidos por azida de sódio (10 mM) e tiourea (150 µM) na eficácia da luz azul antimicrobiana | 53 |
| Figura 15 - Análise de danos em DNA por meio de eletroforese em (a) <i>P. aeruginosa</i> , (b) <i>E. coli</i> e (c) <i>S. aureus</i> submetidos a doses crescentes de irradiação por luz azul antimicrobiana | 54 |

| | |
|--|----|
| Figura 16 - Efeitos da exposição à luz azul antimicrobiana em proteínas de <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> , avaliados por meio da quantificação das proteínas carboniladas (a, b e c) e proteína total bacteriana (d, e e f)..... | 56 |
| Figura 17 - Efeitos da luz azul antimicrobiana sobre os lipídios de (a) <i>P. aeruginosa</i> , (b) <i>S. aureus</i> e (c) <i>E. coli</i> , mensurados pelo marcador de peroxidação lipídica malondialdeído | 57 |
| Figura 18 - Efeitos da luz azul antimicrobiana sobre permeabilização de membrana em <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> , avaliados por meio incorporação de iodeto de propídio (a, b e c) e N-fenil-1-naftilamina (d, e e f)..... | 58 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Parâmetros de irradiação utilizados na padronização de curva de morte bacteriana por luz azul | 36 |
| Tabela 2 - Exposição radiante de luz azul antimicrobiana utilizados para fotoinativação de <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> | 41 |
| Tabela 3 - Média do tempo de inativação bacteriana (min) e erro padrão referentes à dose letal para 90% (DL ₉₀), fator de resistência (T) e valor do coeficiente de determinação (R ²) | 47 |
| Tabela 4 - Comparações de valores de dose letal para inativação de 90 % do inóculo (DL ₉₀) obtidos a partir da cinética de inativação média de <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> submetidos à exposição de luz azul antimicrobiana | 48 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 19 |
| 2.1 | TERAPIAS BASEADAS EM LUZ AO LONGO DA HISTÓRIA | 19 |
| 2.2 | A “BALA MÁGICA” E A ERA DOS ANTIMICROBIANOS | 25 |
| 2.3 | LUZ AZUL ANTIMICROBIANA: A “BALA MÁGICA” DO SÉCULO 21? | 27 |
| 2.4 | MECANISMOS HIPOTETIZADOS PARA A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA LUZ AZUL | 29 |
| 3 | justificativa | 32 |
| 4 | Objetivos gerais | 33 |
| 4.1 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 33 |
| 5 | MATERIAIS E MÉTODOS | 34 |
| 5.1 | MICRORGANISMOS | 34 |
| 5.2 | FONTES DE LUZ | 34 |
| 5.3 | PREPARO DO INÓCULO | 35 |
| 5.4 | PADRONIZAÇÃO DA CURVA DE MORTE BACTERIANA POR LUZ AZUL | 35 |
| 5.5 | MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO | 37 |
| 5.6 | DETECÇÃO DE PORFIRINAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA | 38 |
| 5.7 | MICROSCOPIA CONFOCAL DE IMAGEAMENTO DE TEMPO DE VIDA DE FLUORESCÊNCIA | 38 |
| 5.8 | DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO | 39 |
| 5.9 | DETERMINAÇÃO DO TIPO DE REAÇÃO FOTODINÂMICA | 40 |
| 5.10 | VERIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS DANOS EM DNA | 41 |
| 5.11 | AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS DANOS OXIDATIVOS EM PROTEÍNAS BACTERIANAS | 42 |
| 5.12 | AVALIAÇÃO DE POSSÍVEL PROXIDAÇÃO LIPÍDICA BACTERIAS | 43 |
| 5.13 | AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS DANOS EM MEMBRANA | 44 |
| 6 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 45 |
| 7 | RESULTADOS | 46 |

| | |
|---|-----------|
| 7.1 A LUZ AZUL ANTIMICROBIANA FOI EFICAZ CONTRA OS PATÓGENOS TESTADOS | 46 |
| 7.2 IMAGENS DE MICROSCOPIA DE TRANSMISSÃO EVIDENCIAM ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS..... | 48 |
| 7.3 PORFIRINAS ENDÓGENAS FORAM IDENTIFICADAS EM TODAS AS BACTÉRIAS TESTADAS..... | 49 |
| 7.4 MICROSCOPIA CONFOCAL DE IMAGEAMENTO DE TEMPO DE VIDA DE FLUORESCÊNCIA EVIDENCIOU AMPLA DISTRIBUIÇÃO DE MOLÉCULAS ENDÓGENAS FLUORESCENTES | 50 |
| 7.5 A EXPOSIÇÃO A LUZ AZUL ANTIMICROBIANA RESULTOU EM SIGNIFICATIVA PRODUÇÃO DE EROS EM TODAS AS BACTÉRIAS TESTADAS | 51 |
| 7.6 RADICAL HIDROXILA E OXIGÊNIO SINGLETO CONTRIBUEM PARA A AÇÃO ANTIMICROBIANA DA LUZ AZUL ANTIMICROBIANA..... | 53 |
| 7.7 A LUZ AZUL ANTIMICROBIANA INDUZIU DANOS AO DNA DE <i>S. AUREUS</i> E <i>E. COLI</i> , MAS NÃO INDUZIU DANOS EM <i>P. AERUGINOSA</i> | 54 |
| 7.8 PROTEÍNAS BACTERIANAS SÃO SUSCETÍVEIS À DEGRADAÇÃO APÓS ALTAS DOSES DE EXPOSIÇÃO À LUZ AZUL ANTIMICROBIANA..... | 55 |
| 7.9 A EXPOSIÇÃO POR LUZ AZUL ANTIMICROBIANA INDUZIU PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM <i>P. AERUGINOSA</i> , <i>S. AUREUS</i> E <i>E. COLI</i> | 56 |
| 7.10 A LUZ AZUL ANTIMICROBIANA INDUZIU PERMEABILIZAÇÃO DE MEMBRANA EM <i>P. AERUGINOSA</i> E <i>E. COLI</i> , MAS NÃO INDUZIU PERMEABILIZAÇÃO EM <i>S. AUREUS</i> | 57 |
| 8 DISCUSSÃO..... | 59 |
| 9 CONCLUSÕES..... | 66 |
| REFERÊNCIAS..... | 67 |

1 INTRODUÇÃO

Desde sua introdução, por volta da década de 1940, os antibióticos promoveram uma completa revolução na medicina, possibilitando tratamento e de doenças antes intratáveis. Desde então, os antibióticos salvaram centenas de milhões de vidas, possibilitando avanços em tratamentos e sobrevivência aos pacientes anteriormente condenados (KRESS; FRANCISCO, 1945).

No entanto, o indiscriminado uso de antibióticos utilizados em prol da saúde humana e produção animal vem favorecendo a seleção e disseminação de bactérias resistentes. Conseqüentemente, os medicamentos antibacterianos tornaram-se menos eficazes ou até mesmo ineficazes, tornando a resistência microbiana uma ameaça à saúde global, já prevista por Alexandre Fleming em 1945. Após receber o prêmio Nobel por sua participação na descoberta da penicilina, em entrevista ao jornal *New York Times*, o bacteriologista advertiu que o uso indevido da droga poderia resultar na seleção de bactérias resistentes (FLEMING, 1929; KRESS; FRANCISCO, 1945). De fato, o desenvolvimento de cada nova classe antimicrobiana foi seguido pela detecção de microrganismos resistentes às drogas disponíveis (DAVIES, 1996).

Epidemiologicamente, a pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos associada à habilidade de compartilhamento de material genético das bactérias, possibilitam a evolução de espécies resistentes de maneira extremamente rápida (TACCONELLI et al., 2018). Conseqüentemente, a indústria farmacêutica, que há mais de três décadas não apresenta nenhuma classe importante de antibiótico, enfrenta um grande desafio (LIVERMORE, 2011; MARTENS; DEMAIN, 2017). Neste contexto, autoridades governamentais alertam para a possibilidade de uma era pós-antibióticos cada vez mais próxima (ROBERT R. REDFIELD., 2019; OMS, 2019).

A cada ano, são calculadas mais de 700 mil mortes associadas a infecções causadas por bactérias resistentes, incluindo mais de 230 mil mortes relacionadas a cepas resistentes causadoras de tuberculose. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, estima-se que a resistência antimicrobiana poderá causar 10 milhões de mortes a cada ano até 2050 (OMS, 2019). Temerosos à crise dos antibióticos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e autoridades internacionais exigem uma ação imediata e coordenada entre países. Reconhecendo que a saúde humana, animal e ambiental estão intimamente interligadas, a abordagem de saúde única torna-se primordial (OMS, 2019).

Seguindo a essa mandatoriedade, em 2020 o governo dos EUA anunciou um plano de ação nacional para combater as bactérias resistentes a antibióticos (2020-2025). O plano tem como objetivo intensificar a pesquisa e o desenvolvimento de novas terapias alternativas combinadas no combate a infecções bacterianas. De acordo com autoridades do FDA (*Food and Drug Administration Agency*, EUA), o combate de bactérias resistentes deve abranger duas vertentes: o desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas alternativas e a preservação de antimicrobianos atualmente disponíveis (FDA, 2020).

Neste contexto, a luz azul antimicrobiana destaca-se como uma abordagem promissora, capaz de combater microrganismos patogênicos resistentes sem promover resistência antimicrobiana, além de proporcionar segurança ao organismo humano ou animal. No entanto, o conhecimento aprofundado dos mecanismos de ação da luz azul antimicrobiana torna-se de extrema importância para aperfeiçoamento da técnica e suas futuras aplicações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TERAPIAS BASEADAS EM LUZ AO LONGO DA HISTÓRIA

Ao longo dos séculos, as terapias baseadas em luz têm acompanhado o desenvolvimento da humanidade, sendo utilizadas no tratamento de doenças ao redor do mundo. Civilizações antigas foram marcadas por cultos de adoração ao sol, não apenas por sua importância na agricultura, mas também por suas propriedades curativas (DANIELL; HILL, 1991; HOLLOWAY, 1997; HAMBLIN; HUANG, 2013).

Possivelmente o registro mais antigo evidenciando a veneração ao sol date de mais de 5000 a.C.. No relevo demonstrado na **Figura 1**, observa-se o faraó egípcio Akhenaton, sua esposa Nefertiti e três de suas filhas expondo-se aos raios curativos do sol. Na imagem, os raios que emanam do sol revelam uma representação comum na época, simbolizando Deus e energias espirituais. (HOLLOWAY, 1997; MCDONAGH, 2001; ALPERT, 2015).

Ainda no Egito, documentos datados de mais de 3000 a.C., no chamado Papiro de Ebers, mencionavam a ingestão de extratos derivados de ervas nativas do rio Nilo (*Ammi majus* L.) seguido pela exposição ao sol para o tratamento de vitiligo (HAMBLIN; HUANG, 2013). Paralelamente, na Índia, escrituras do livro sagrado *Atharvaveda* também descreviam o tratamento de vitiligo por meio de ingestão de sementes da planta *Bavachee* (*Psoralea corylifolia*) em associação à exposição à luz solar (DANIELL; HILL, 1991). A associação também foi utilizada na medicina chinesa para fins semelhantes (WYSS, 2000).

Já no século 525 a.C., Heródoto, conhecido como pai da helioterapia, destacava a importância da exposição ao sol com propósito terapêutico. Em suas observações ele correlacionava a resistência dos ossos ao grau de exposição ao sol: “Percebi que os crânios dos persas são tão finos que o mais leve toque de um seixo os perfura. Os dos egípcios, por outro lado, são tão resistentes que dificilmente é possível quebrá-los com uma pedra”. Heródoto acreditava que o motivo estaria associado ao fato de egípcios terem a cabeça raspada desde a infância, aumentando a exposição ao sol (HÖNIGSMANN, 2013). Nesta época, grandes solários foram construídos na Grécia, visando a exposição do corpo ao sol. Esses solários também

eram utilizados na preparação física de atletas para os jogos olímpicos (DANIELL; HILL, 1991).

Figura 1 - Faraó egípcio Akhenaton, sua esposa Nefertiti e três de suas filhas expondo-se aos raios curativos do sol



Fonte: Holloway, (1997)

No entanto, com o advento do cristianismo durante a idade média, a adoração pelo sol e sua utilização como modalidade terapêutica passaram a ser consideradas práticas pagãs (DANIELL; HILL, 1991). Banhos de sol deixaram de ser praticados pela oligarquia, tornando-se prática comum dos servos, que eram expostos ao sol enquanto trabalhavam no campo (BLOCH, 1990). Dessa forma, as terapias baseadas em luz permaneceram esquecida por séculos (DANIELL; HILL, 1991; HAMBLIN; HUANG, 2013).

Já partir do final do século XVII, filosofias baseadas em princípios científicos surgiram na Europa e forneceram a base para a compreensão da relação entre os humanos e a luz. Dando início a então fototerapia moderna, o período foi marcado por invenções e fontes de luz artificiais e naturais modificadas, gerando bases para os primeiros estudos (HOLLOWAY, 1997; HAMBLIN; HUANG, 2013).

Dentre as descobertas da época estão incluídas a de Isaac Newton, que em 1666 reportou a refração da luz solar através de um prisma em suas sete cores componentes do espectro visível. Em 1678, Christian Huygens descreveu a natureza ondulatória da luz. Já em 1800, Friedrich Herschel descobre o espectro infravermelho

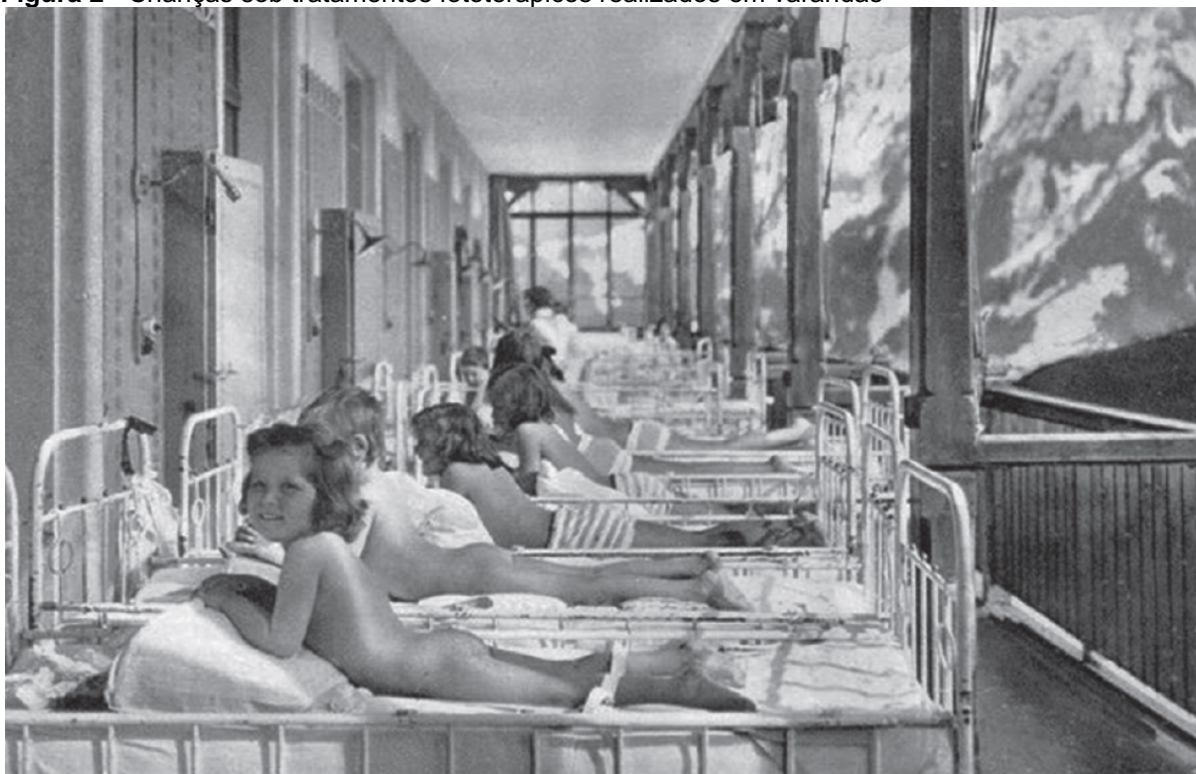
do sol, seguida pela descoberta da radiação ultravioleta (UV) por Johann Wilhelm Ritter em 1801; considerados espectros invisíveis aos olhos (FRERCKS; WEBER; WIESENFELDT, 2009). No ano de 1820, Hans Oerstedt descobre a corrente elétrica. Um ano depois, Michael Faraday descreve a indução eletromagnética como fonte de energia e constrói o primeiro gerador elétrico. Mais tarde, em 1878, Thomas Edison desenvolve a lâmpada elétrica utilizando como fonte de energia (GRZYBOWSKI; SAK; PAWLIKOWSKI, 2016).

Paralelamente, relatos clínicos de utilização de terapias baseadas em luz começavam a ser reportados. Em 1735, Fiennius descreveu a cura de um tumor cancerígeno no lábio usando banhos de sol (GIESE, 1964). Em 1774, Faure relatou o tratamento de úlceras cutâneas, também por meio de luz solar (RUSSELL; RUSSELL, 1927). Em 1776, LePeyre e LeConte observaram que a luz solar concentrada através de uma lente acelerava a cicatrização de feridas cutâneas e a destruição de tumores (ROLLIER, 1923).

Em 1845, Bonnet relatou pela primeira vez que a luz solar poderia ser usada para tratar a artrite tuberculosa. Já em 1877, Arthur Downes e Thomas Blunt reportaram a inibição de crescimento bacteriano por meio da exposição à luz solar. Os pesquisadores evidenciaram que a ação bactericida estava associada primariamente ao componente violeta-azul do espectro, fornecendo a base para o uso clínico extensivo de fototerapia (HOCKBERGER, 2000).

Já no final do século XIX, a helioterapia tornava-se gradualmente popular. Os chamados “sanatórios do sol” foram construídos na tentativa de combate aos inúmeros casos de tuberculose existentes na época (ROELANDTS, 2002). Dentre os pioneiros dessa tendência estão Arnold Rikli, Oskar Bernharde e August Rollier, também conhecidos como “apóstolos solares”. Os tratamentos eram realizados em condições frias do sol de inverno ou em varandas, reduzindo a superexposição a luz solar (**Figura 2**). Outras condições incluindo raquitismo, escorbuto, reumatismo, paralisia, edema e fraqueza muscular também eram tratadas em sanatórios solares. No entanto, somente na virada para o século XX os tratamentos fototerápicos começam a ser propagados.

Figura 2 - Crianças sob tratamentos fototerápicos realizados em varandas



Fonte: Hamblin & Huang (2014)

A partir de estudos publicados pelo médico e cientista dinamarquês Niels Ryberg Finsen, no ano de 1889, iniciou-se uma nova era para as terapias baseadas em luz. Em seu primeiro livro *“La Phototherapie”*, Finsen descrevia o tratamento para tuberculose cutânea (**Figura 3**), baseado em exposição solar concentrada por lentes ou fontes de luz elétricas (**Figura 4 e 5**). Em seu livro, comprovou o efeito positivo da terapia de luz realizado em centenas de pacientes em seu instituto *“Finsen Medical Light Institute”* (FINSEN, 1899). Na mesma época, Finsen também desenvolveu tratamento para varíola utilizando filtros para obtenção de luz vermelha, visando a melhora na cicatrização. Também eram implementadas terapias baseadas em luz solar para tratamento de outras doenças comuns da época como tuberculose pulmonar e raquitismo (FINSEN, 1899).

Figure 3 - Antes e depois do tratamento de lesões de lúpus vulgaris utilizando terapia de Niels Finsen



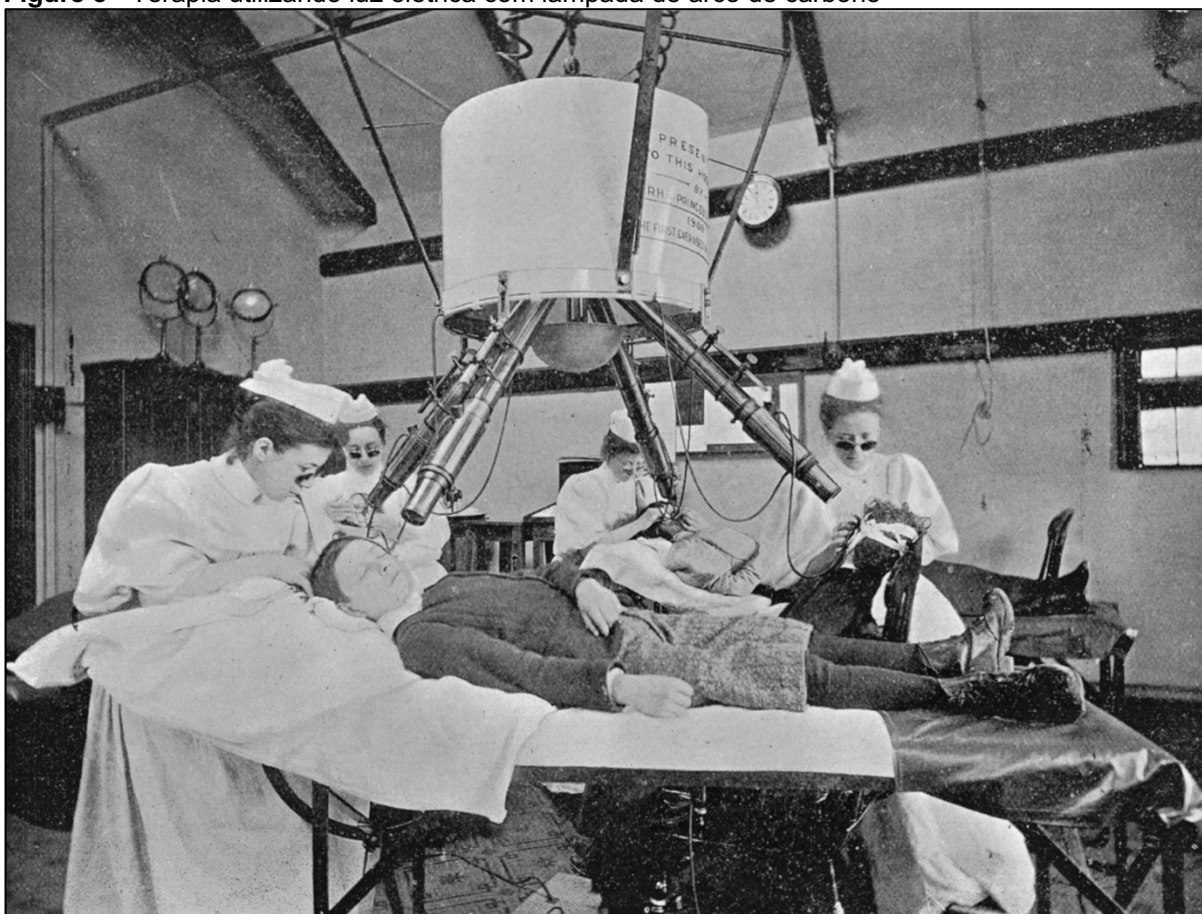
Fonte: Holloway (1997)

Figura 4 - Terapia utilizando aparelho de Finsen permitindo concentração dos raios solares



Fonte: Holloway (1997)

Figure 5 - Terapia utilizando luz elétrica com lâmpada de arco de carbono



Fonte: Holloway (1997)

Dentre 1895 e 1902, Finsen realizou o tratamento de tuberculose cutânea de 800 pacientes em seu instituto. Do total de pacientes, 56% apresentaram completa recuperação, 26% apresentaram melhora significativa, 12% apresentaram melhora parcial do quadro e 6% não apresentaram nenhuma melhora. Interessantemente, segundo o histórico médico, esses pacientes permaneceram estáveis, independentemente do tratamento utilizando lâmpada de arco de carbono associada luz elétrica ou exposição solar concentrada por lentes de vidro (FINSSEN, 1899; MOLLER et al., 2005).

Em uma época em que não havia antibióticos ou anti-inflamatórios disponíveis, a fototerapia foi um grande avanço. Como resultado, em 1903 Finsen foi agraciado com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina, em reconhecimento a sua contribuição para o tratamento de doenças com radiação de luz concentrada, abrindo um novo caminho para a ciência médica. Como resultado, muitas clínicas no norte da Europa adotaram as técnicas de Finsen (HOLLOWAY, 1997; MOLLER et al., 2005; HAMBLIN; HUANG, 2013).

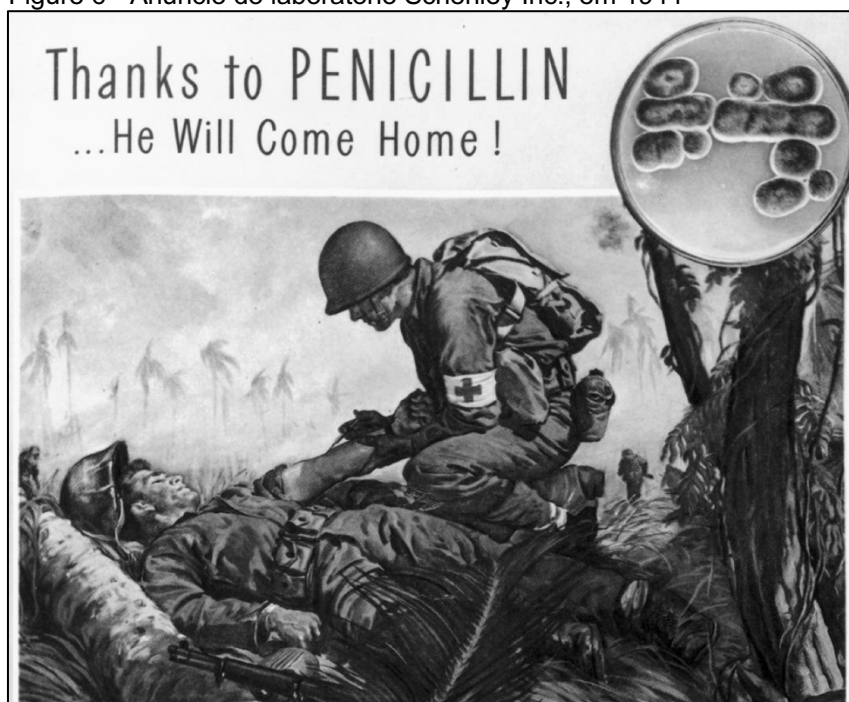
Embora Finsen como médico entusiasta tivesse o interesse em conhecer todos os benefícios que o sol realmente trazia, não foi capaz de desvendar cientificamente os mecanismos de ação da luz em seus tratamentos (HAMBLIN; HUANG, 2013). No entanto, a prática da exposição à luz solar natural ou de lâmpadas de quartzo ainda foram amplamente utilizadas durante a Primeira Guerra Mundial (1914 – 1918). Países como Alemanha, Reino Unido, França e Itália possuíam os chamados “departamentos especiais de radiação” para o tratamento de combatentes feridos (HOLLOWAY, 1997).

2.2 A “BALA MÁGICA” E A ERA DOS ANTIMICROBIANOS

Paralelamente, em consequência aos surtos infecciosos que ocorriam na Europa, pesquisadores e estudiosos continuavam em busca por alternativas terapêuticas. Foi nessa época que o médico e cientista alemão Paul Ehrlich desenvolveu o conceito de terapêutica “bala mágica”. Definida como uma terapia seletiva, Paul Ehrlich esperava desenvolver uma estratégia capaz de erradicar agentes infecciosos, sem prejudicar o hospedeiro (SCHWARTZ, 2004). Dessa forma, em 1910, Ehrlich desenvolveu o primeiro composto químico 'bala mágica' conhecido como Salvarsan, que possibilitou o tratamento de sífilis e tripanossomíase (EHRlich, 1913; GELPI; GILBERTSON; TUCKER, 2015).

No entanto, a descoberta do primeiro antibiótico ocorreu apenas 20 anos mais tarde, acidentalmente, em um laboratório em Londres pertencente ao bacteriologista Alexandre Fleming (KRESS; FRANCISCO, 1945; RAJU, 1999; LIGON, 2004). Assim que a produção em massa da penicilina se tornou possível, o uso do antibiótico se popularizou e revolucionou a medicina. Já na Segunda Guerra Mundial (1940 - 1945), a droga foi extensivamente utilizada no tratamento de feridos em campos de batalha. A penicilina rapidamente se tornou conhecida como a “droga milagrosa” da guerra (**Figura 6**), curando doenças infecciosas e salvando milhões de vidas (HUTTNER et al., 2013). Com as facilidades do uso de antibióticos, o interesse pelo uso de terapias baseadas em luz foi deixado de lado e considerado obsoleto durante anos (ROELANDTS, 2002).

Figure 6 - Anúncio do laboratório Schenley Inc., em 1944



Fonte: Huttner *et al.* (2013)

Legenda: “Graças à Penicilina... ele vai voltar para casa”. O anúncio afirmava que a maior notícia da Segunda Guerra Mundial seria a descoberta e o desenvolvimento da penicilina

Entretanto, após ser agraciado com Prêmio Nobel em fisiologia e medicina em 1945 por sua participação na descoberta da penicilina, em entrevista ao jornal *New York Times*, Alexandre Fleming advertiu sobre os riscos do uso indevido do antibiótico e a possibilidade de desenvolvimento de resistência pelas bactérias se usado indiscriminadamente (FLEMING, 1929; KRESS; FRANCISCO, 1945).

Por certo, a penicilina revolucionou a medicina e o controle de infecções. No entanto, em curto período a resistência à penicilina tornou-se um problema clínico substancial, de modo que, na década de 1950, muitos dos avanços da década anterior já eram ameaçados (VENTOLA, 2015). Nas décadas seguintes, novas classes de antibióticos foram desenvolvidas, embora seguidas pela detecção de microrganismos resistentes (DAVIES, 1996).

De fato, o abuso global de antibióticos desempenhou um papel importante na seleção da resistência antimicrobiana, que atualmente representa ameaça global contra a saúde pública. A pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos associada a habilidade de compartilhamento de material genético das bactérias, possibilitam a evolução de espécies resistentes (TACCONELLI *et al.*, 2018). Por consequência, a indústria farmacêutica, que há mais de três décadas não apresenta

nenhuma classe importante de antibiótico, corre contra o tempo (LIVERMORE, 2011; MARTENS; DEMAIN, 2017).

Atualmente a Organização Mundial da Saúde aponta a resistência aos antibióticos como uma das principais ameaças à saúde pública do século 21 (OMS, 2019). As autoridades governamentais alertam para a possibilidade de uma era pós-antibióticos (ROBERT R. REDFIELD., 2019; OMS, 2019). Assim, embora os antibióticos convencionais se encaixem nos critérios de Ehrlich de "balas mágicas", à medida que entramos na era pós-antibiótico torna-se inadiável a busca de novas terapias seletivas.

2.3 LUZ AZUL ANTIMICROBIANA: A "BALA MÁGICA" DO SÉCULO 21?

A luz azul antimicrobiana ($\lambda = 400 - 470 \text{ nm}$) tem atraído a atenção por representar uma importante alternativa aos antimicrobianos convencionais (ZHANG et al., 2014b; WANG et al., 2016, 2017a; BUMAH et al., 2021). Até o momento, uma ampla gama de espécies microbianas já foram estudadas, demonstrando que a luz azul pode ser altamente eficaz na inativação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, micobactérias, fungos, leveduras e algas patogênicas (WANG et al., 2017a; DOS ANJOS et al., 2019a, 2020a; LEANSE et al., 2021).

São hipotetizados que a atividade antimicrobiana da luz azul baseie-se na absorção de fótons por moléculas endógenas foto-excitáveis (*i.e.*, porfirinas e flavinas), comumente encontradas nesses microrganismos (HAMBLIN et al., 2005; DAI et al., 2012). Dessa forma, não surpreendentemente, a faixa de comprimento de onda entre 400-420 nm é reportada como sendo a mais eficaz, por compreender o intervalo de pico de absorção de porfirinas (SCHMID et al., 2019; AL-SHAMMARY et al., 2020; ANGARANO et al., 2020a, 2020b). No entanto, alguns pesquisadores sugerem que o uso de comprimentos mais longos 450-470nm possam apresentar efeitos antimicrobianos em algumas espécies (DONG et al., 2019; HUI et al., 2020; LEANSE; ZENG; DAI, 2021).

De maneira geral, a atividade antimicrobiana da luz azul possui como maior vantagem o mecanismo intrínseco, dispensando o uso de fotossensibilizadores exógenos ou a necessidade de outras substâncias. À vista disso, sua aplicação tem atraído especial atenção dentro da indústria alimentícia, sugerindo eficácia no controle

da contaminação de alimentos (PALGAN et al., 2011; GHATE et al., 2016; SRIMAGAL; RAMESH; SAHU, 2016; DOS ANJOS et al., 2020a). Da mesma maneira, a luz azul antimicrobiana apresenta importante aplicabilidade na descontaminação de superfícies e ambientes com alto risco de contaminação, como hospitais, laboratórios e consultórios odontológicos (MACLEAN et al., 2010, 2014; BACHE et al., 2018).

Inúmeros estudos têm demonstrado *in vitro* a alta efetividade da luz azul desafiando diferentes patógenos causadores de infecções cutâneas, gástricas, urogenitais, intestinais, orais, entre outras (WANG et al., 2017b; AL HAMZI et al., 2019; FELIX GOMEZ et al., 2019; BUMAH et al., 2020b; MEURER; PAYNE; GUFFEY, 2020; ZHANG et al., 2020; MOHAMAD et al., 2021; ZHAO; ZHANG; DONG, 2021). Até mesmo biofilmes bacterianos, caracterizados por sua inerente resistência aos antimicrobianos convencionais, demonstraram susceptibilidade aos tratamentos pela luz azul (FILA et al., 2018; WU et al., 2018; FERRER-ESPADA et al., 2019a, 2019b).

Interessantemente, sua atividade antimicrobiana não se limita à patógenos resistentes a antibióticos, demonstrando alta efetividade mesmo em organismos multirresistentes (DOS ANJOS et al., 2019b, 2020b). Tão pouco, sua atividade permite o desenvolvimento de mecanismos de tolerância pelo microrganismo. Estudos não evidenciaram desenvolvimento de tolerância a luz azul mesmo após inúmeros ciclos de exposição e passagem bacteriana (TOMB et al., 2017; LEANSE et al., 2018). No entanto, a luz azul antimicrobiana demonstra compatibilidade à associações terapêuticas utilizando antimicrobianos convencionais (WOZNIAK et al., 2019) e não convencionais (HYUN; CHOI; LEE, 2020; LEANSE et al., 2020a; LEANSE; GOH; DAI, 2020; LEANSE; ZENG; DAI, 2021).

É importante ressaltar que a luz azul antimicrobiana apresenta alta seletividade aos patógenos microbianos, demonstrando extrema segurança sobre células do hospedeiro (DAI et al., 2012; ZHANG et al., 2014b; WANG et al., 2016; BUMAH et al., 2021). Da mesma forma, estudos que avaliaram a atividade antimicrobiana da luz azul *in vivo* também retrataram a existência de uma janela terapêutica, possibilitando o tratamento antimicrobiano sem provocar danos aos tecidos do hospedeiro (DAI et al., 2012; RUPEL et al., 2019; LEANSE et al., 2020b). Estudos clínicos evidenciam resultados encorajadores ao avaliarem a utilização da luz azul antimicrobiana no tratamento de acne vulgaris (GOLD et al., ; WHEELAND; DHAWAN, 2011; ALBA et al., 2017), infecções vaginais (PAVIE et al., 2019), além do tratamento infecções

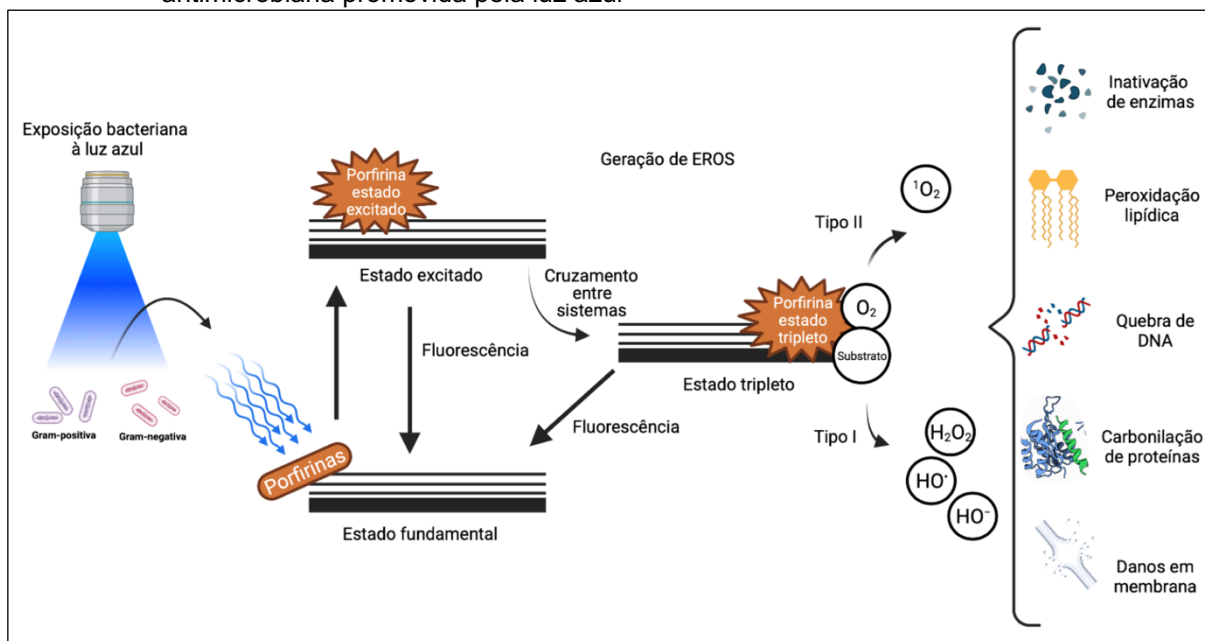
gástricas (GANZ et al., 2005; LEMBO et al., 2009), despertando interesse por sua introdução na rotina clínica.

2.4 MECANISMOS HIPOTETIZADOS PARA A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA LUZ AZUL

Uma vez que a luz azul antimicrobiana tem sido considerada uma opção viável para o tratamento de agentes infecciosos, pesquisadores tentam esclarecer seu mecanismo de ação (PLAVSKII et al., 2018; WU et al., 2018; BUMAH et al., 2020a; HYUN; LEE, 2020). Embora ainda não seja completamente elucidado, a hipótese comumente aceita envolve a presença de pigmentos endógenos foto-excitáveis, como porfirinas e flavinas, presentes em bactérias e fungos (WANG et al., 2019b; LEANSE et al., 2021). Acredita-se que a reação fotodinâmica promovida pela luz azul nesses pigmentos endógenos se assemelhe muito ao mecanismo promovido pela terapia fotodinâmica, que utiliza fotossensibilizador exógeno (HAMBLIN et al., 2005; DAI et al., 2012).

De maneira simplificada (**Figura 7**), acredita-se que ao absorverem luz em comprimento de onda específico essas moléculas são promovidas ao estado excitado (DAI et al., 2012). Em sequência, ao reagirem com o oxigênio molecular as porfirinas em estado tripleto desencadeiam a produção de espécies reativas de oxigênio por dois mecanismos: transferência de energia ou transferência de elétrons, conhecidas como reação fotodinâmica do tipo I ou II, respectivamente. Por meio da transferência de energia são produzidos oxigênio singleto (1O_2), uma espécie molecular altamente reativa e transitória; e através de transferência de elétrons são geradas outras espécies reativas de oxigênio como radicais hidroxila (HO^{\bullet}), ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HUANG et al., 2013; BAPTISTA et al., 2017).

Figure 7 - Desenho esquemático representando mecanismos hipotetizados para a atividade antimicrobiana promovida pela luz azul



Fonte: dos Anjos (2021)

Acredita-se que espécies reativas de oxigênio produzidas sejam responsáveis por gerarem danos estruturais, desencadeando a morte do microrganismo por degenerações oxidativas (HAMBLIN et al., 2005; DAI et al., 2012; WU et al., 2018). Até o momento, estudos apontam inúmeros alvos para a luz azul antimicrobiana, incluindo danos em DNA, proteínas, lipídios e membrana celular (ASHKENAZI et al., 2003; DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009; DAI et al., 2012; YIN et al., 2013; WANG et al., 2017a).

No entanto, diferentes microrganismos podem demonstrar suscetibilidades variáveis à luz azul. Dessa forma, sugere-se que as discrepâncias na tolerância a luz azul podem ser decorrentes de diferenças específicas do organismo nos níveis de porfirina, tipo de porfirina (*i.e.* protoporfirina, coproporfirina ou uroporfirina) e localização ou proximidades a moléculas susceptíveis (PLAVSKII et al., 2018; WU et al., 2018; BUMAH et al., 2020a; HYUN; LEE, 2020). Especula-se também que espécies bacterianas menos tolerantes ao oxigênio podem ser particularmente mais suscetíveis aos efeitos da EROS (JEAN; BRIOLAT; REYSSET, 2004). No entanto, a presença de antioxidantes podem tornar o microrganismo mais tolerante a luz azul (DONG et al., 2019; HUI et al., 2020; LEANSE; ZENG; DAI, 2021). Contudo, até o presente momento não existem evidências substanciais detalhadas para confirmar os

alvos de ação antimicrobiana, ou o papel direto de EROS envolvidos na atividade antimicrobiana da luz azul.

3 JUSTIFICATIVA

A resistência antimicrobiana torna-se na atualidade uma crescente ameaça global. A eficácia dos antimicrobianos, considerados pré-requisitos para medidas preventivas e curativas na medicina humana e na produção de alimentos encontram-se em risco. Dessa forma, autoridades globais alertam para a urgência no desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas alternativas e/ou preservação de antimicrobianos atualmente disponíveis. Acreditando que a luz azul antimicrobiana seja uma abordagem promissora no tratamento de infecções, torna-se de extrema importância a compreensão dos seus mecanismos de ação, que possibilitarão no futuro otimização e/ou associação com terapias combinadas.

4 OBJETIVOS GERAIS

O estudo teve como objetivo testar hipóteses comuns relacionadas aos alvos biológicos de morte bacteriana induzida pela exposição a luz azul antimicrobiana.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronização da curva de morte de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* expostos a luz azul antimicrobiana;
- Avaliação de danos ultra estruturais promovidos pela exposição a luz azul antimicrobiana;
- Determinação do tipo de reação fotodinâmica predominante de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* submetidos a luz azul antimicrobiana;
- Avaliação do perfil de distribuição espacial de moléculas endógenas fluorescentes em *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*;
- Identificação e quantificação de porfirinas endógenas presentes em *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*;
- Verificação da ocorrência de possíveis quebras de dupla-fita de DNA bacteriano promovidos pela exposição a luz azul antimicrobiana;
- Mensuração de danos oxidativos em proteínas bacterianas promovidos pela exposição a luz azul antimicrobiana;
- Mensuração de peroxidação lipídica induzidas pela exposição bacteriana a luz azul antimicrobiana;
- Avaliação da integridade de membrana de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* submetidas a exposições a luz azul antimicrobiana;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

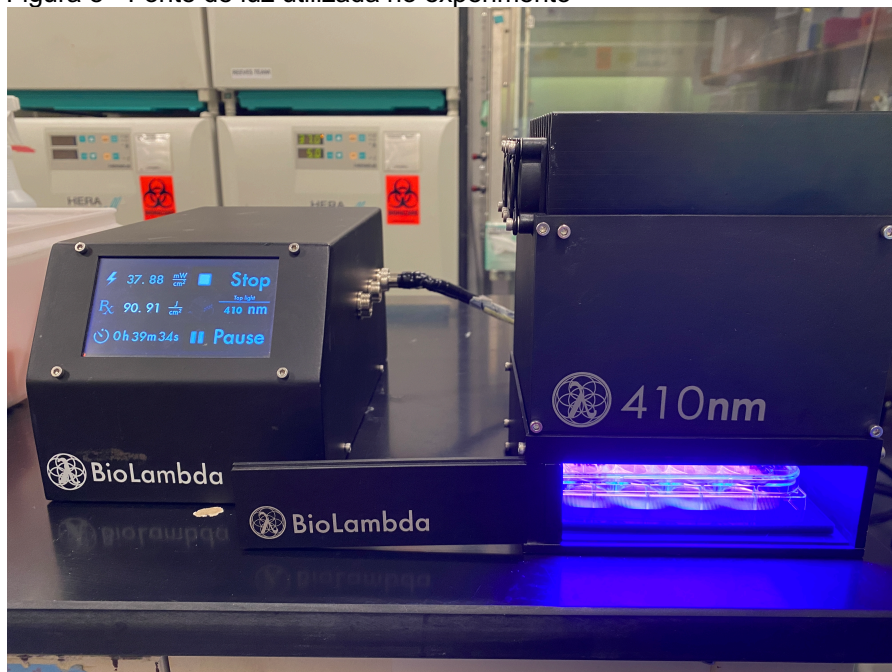
5.1 MICRORGANISMOS

Para a padronização do estudo foram utilizadas três diferentes espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), obtidos a partir da American Type Culture Collection (ATCC).

5.2 FONTES DE LUZ

Utilizou-se um sistema de irradiação homogêneo de LEDs (**Figura 8**), com emissão de comprimento de onda de 410 nm e irradiância de 38,2 mW/cm², modelo comercial Ledbox[®] (BioLambda, São Paulo).

Figura 8 - Fonte de luz utilizada no experimento



Fonte: dos Anjos (2021)

A densidade de energia (DE) aplicada sobre os microrganismos foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$DE = \frac{P \cdot t}{A} \qquad t = \frac{DE \cdot A}{P}$$

Onde:

DE = densidade de energia (J/cm²);

P = potência do aparelho (W);

t = tempo (s);

A = área de secção transversal do feixe de luz (cm²) do aparelho emissor.

5.3 PREPARO DO INÓCULO

As cepas selecionadas para o estudo foram semeadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI). O crescimento foi realizado em condições de aerobiose, à 36 ± 1°C, em estufa rotatória, durante 16-18h (*overnight*). Após o crescimento, os microrganismos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o material ressuspendido PBS estéril (NaCl 137 mM, fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM, pH = 7,0). O processo de lavagem do inóculo foi repetido duas vezes.

O ajuste do inóculo foi determinado por turbidez da suspensão, avaliado por espectrofotometria. A absorbância da suspensão em PBS estéril foi ajustada entre 0,67 à λ= 625 nm, que resultou em suspensão contendo aproximadamente 1–2 x 10⁹ UFC/mL.

5.4 PADRONIZAÇÃO DA CURVA DE MORTE BACTERIANA POR LUZ AZUL

A padronização da curva de morte bacteriana foi realizada a partir da irradiação de 1 mL do inóculo bacteriano, contendo 1 a 2 x 10⁹ UFC/mL, em placa de 12 poços. Todas as cepas selecionadas para o estudo foram submetidas a 11 níveis de irradiação, incluindo amostra controle (não irradiada), com intervalos de 10 min (*i.e.*: 22,68 J/cm²) entre amostras (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Parâmetros de irradiação utilizados na padronização de curva de morte bacteriana por luz azul

| Parâmetros de irradiação | | | | | | | | | | |
|--------------------------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Minutos | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
| J/cm² | 22,9 | 45,8 | 68,7 | 91,6 | 114,5 | 137,5 | 160,4 | 183,3 | 206,2 | 229,1 |

Fonte: dos Anjos (2021)

Após cada nível de irradiação, alíquotas de 20 µL foram transferidas para placa de 96 poços, contendo 180 µL de solução de PBS estéril. Subsequentemente, as amostras foram submetidas a diluição seriada até a concentração 10⁻⁶.

Por meio de uma pipeta multicanal foram retiradas alíquotas previamente homogeneizadas de 10 µL, referente às diferentes concentrações: 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶, pertencentes ao mesmo nível de irradiação. Em seguida, as amostras foram semeadas em forma de estrias em placas de ágar BHI, conforme metodologia descrita por Jett *et al.* (1997). As amostras foram incubadas em condições de aerobiose à 36 ± 1°C, durante 24 h, seguida pela contagem das colônias.

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicatas técnicas e repetidos em três dias experimentais diferentes, totalizando nove repetições para cada microrganismo. As médias de fração de sobrevivência dos resultados obtidos de cada grupo experimental foram calculadas e normalizadas em relação ao máximo (N₀/N; carga microbiana inicial/carga microbiana final), indicando a fração de redução da contagem de UFC/mL. Subsequentemente os dados foram transformados em escala logarítmica de base 10 (Log₁₀).

Por meio de adaptação do método estatístico de Weibull, desenvolvido por Sabino *et al.* (2019), calculou-se a dose letal teórica para inativação dos microrganismos avaliados. A equação fornece valores de duas constantes referentes à cinética de inativação: dose letal para 90% (DL₉₀) e o fator de tolerância (T), referente à direção da concavidade da curva ajustada (ou seja, T>1: concavidade para baixo; T<1: concavidade para cima). A partir desses valores calculados, foram estimados a dose letal para a redução de 50% (DL₅₀), 90% (DL₉₀), 99,9% (DL_{99,9}) e esterilização da amostra (DL₁₀₀), considerando-se o inoculo inicial de 1 a 2 x 10⁹ UFC/mL.

5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A Microscopia de Transmissão Eletrônica (TEM) teve por objetivo possibilitar a observação de possíveis danos estruturais bacterianos, tais como formação de vacúolos, degradação de ribossomos e presença de células sem conteúdo intracelular (consequência de ruptura de membrana), promovidos durante a fotoinativação por luz azul (DAI et al., 2013a; ZHANG et al., 2014a).

O preparo do inoculo e irradiação das amostras foram realizados conforme descrito previamente. Optou-se para o estudo a avaliação das amostras referente a DL₉₀, DL_{99,9} e amostra controle (não irradiada) das três cepas estudadas. Para obtenção de quantidade de células suficientes para o preparo no material, foram utilizadas amostras pertencentes à dois poços irradiados. As amostras foram acondicionadas em tubos tipo Ependorff e centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2%, por duas horas, à 4°C. Após esse período, as amostras foram pós-fixadas em solução à 1% de tetróxido de ósmio com cacodilato de sódio à 2 M e pH 7,3, por 2 h. Em seguida, foram mantidas *overnight* em solução acetato de uranila a 2% em sacarose à 10,6%.

Para o processo de desidratação, as amostras foram submetidas a duplo tratamento durante 15 min em concentrações crescentes de álcool (70, 95 e 100%) e então submetidas a dois tratamentos de 15 min em óxido de propileno. Após o processo de desidratação, o material foi incluído em resina adicionada de óxido de propileno e acondicionados em formas. Para polimerização, foram mantidas em estufa à 75°C durante 30 h.

Os blocos foram submetidos à trimagem e então cortados em ultra micrótomo (LEICA EM UC 6, Vienna, Áustria) para obtenção de cortes semi-finos (0,5 µm). Os cortes foram posicionados em lâminas histológicas e corados com azul de toluidina 1%, servindo de orientação para cortes ultrafinos (80-90 nm). As amostras em cortes ultrafinos foram posicionadas em grade de cobre (malha 200), contrastados com acetado de uranila a 4%, por 5 min no escuro, e citrato de chumbo a 0,3%, por 15 min.

A observação e captação das imagens foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL, model 1010, Tokyo, Japan), em aumentos de até 100.000x, operando em 80 KV.

5.6 DETECÇÃO DE PORFIRINAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA

O método de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC, *Ultra-high performance liquid chromatography*) foi utilizado para a identificação e quantificação de porfirinas endógenas em células bacterianas (WANG et al., 2019a; LIU et al., 2020). Para o preparo da amostra, colônias bacterianas de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* foram inoculadas em caldo BHI (3 tubos cônicos de 50 mL contendo 20 mL de meio para cada cepa testada) e mantidas em estufa rotatória à $36 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 16-18h. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 min, possibilitando o descarte do sobrenadante. Os *pellets* resultantes dos três tubos pertencentes a mesma cepa foram agrupados e submetidos a lavagem em PBS para remoção de resíduos de meio de cultura. Subsequentemente, os pellets foram ressuspensos em 1 mL de solução de extração contendo etanol, dimetilsulfóxido, ácido acético (na proporção 80: 20: 1; vol/vol/vol) e armazenados em freezer -80°C durante 24 h. Posteriormente, as células bacterianas foram rompidas por meio de banho ultrassônico na frequência de 40 KHz (Branson 2510R-MT, Danbury, CT). As amostras foram então centrifugadas para remoção de debris e o sobrenadante utilizado para análise cromatográfica, conforme descrito por Wang *et al.*, (2019). Em resumo, foram utilizados marcadores cromatográficos possibilitando a detecção de uroporfirina, heptaporfirina hexaporfirinas, pentaporfirinas, coproporfirinas e protoporfirina IX (Frontier Scientific, Logan, UT). A quantificação de porfirinas por UPLC foi realizado por meio do sistema Waters® Acquity UPLC.

5.7 MICROSCOPIA CONFOCAL DE IMAGEAMENTO DE TEMPO DE VIDA DE FLUORESCÊNCIA

A microscopia confocal de imageamento de tempo de vida de fluorescência (*Fluorescence-lifetime imaging microscopy* - FLIM) consiste na aquisição bidimensional de imagens indicadoras do perfil de decaimento do estado excitado de espécies fluorescentes, por meio de varrimento espacial das células bacterianas. A informação resultante da FLIM é uma imagem em que cada pixel representa o perfil

de decaimento da respetiva espécie fluorescente, presente no ponto espacial onde a aquisição ocorreu (VAN MUNSTER; GADELLA, 2005).

As cepas avaliadas (*S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*) foram semeadas em caldo BHI. O crescimento foi realizado em condições de aerobiose à $36 \pm 1^\circ\text{C}$, em estufa rotatória (tipo *shaker*), *overnight*. Após o crescimento, os microrganismos foram acondicionados em tubos tipo Ependorff e centrifugados a 10.000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o material ressuspendido em 1 mL de PBS estéril. O processo de lavagem do inóculo foi repetido duas vezes. Ao *pellet* foi então adicionado 1 mL de solução de glutaraldeído à 2% e mantido sob refrigeração por 1 h. Após esse período realizou-se nova lavagem e ressuspensão em PBS. Amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento da leitura. As lamínulas utilizadas para microscopia foram previamente tratadas com solução de Polilisina à 1% (Sigma, Saint Louis, EUA) e mantidas *overnight* em estufa a 60°C para secagem. As lamínulas foram submetidas a enxague em água MiliQ® e novo processo de secagem.

A avaliação o perfil de decaimento do estado excitado de espécies fluorescentes intracelulares foi realizado por FLIM utilizando-se microscópio (MicroTime 200, PicoQuant), equipado com fotomultiplicador próprio, 404 (20) nm, filtro de passagem de banda de 590 (20), pulso curto (<1 ns) e objetiva com aumento de 60 x para analisar amostras em um nível de super resolução (ou seja, abaixo do limite de difração da luz). As imagens e os dados obtidos foram analisados por software (SymphoTime 64, PicoQuant).

5.8 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Espécies reativas de oxigênio (EROS) produzidas após exposição bacteriana à luz azul foram quantificadas por meio de ensaio fluorimétrico, utilizando o marcador 2', 7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA). Altamente permeável, o DCFH-DA é hidrolisado por esterases no ambiente intracelular, assumindo a forma não-fluorescente DCFH. Após ação de peroxidases, primariamente promovidas por H_2O_2 , é convertido à DCF, sua forma fluorescente, utilizado como marcador de processos oxidativos (WANG; JOSEPH, 1999).

Neste estudo, os inoculos de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* foram cultivados e preparados em PBS na concentração de $1-2 \times 10^9$ UFC/mL. Para o teste

fluorimétrico, o reagente DCFH-DA (D6883, Sigma-Aldrich) foi adicionado às amostras na concentração final de 20 μM . Em seguida, foram incubadas à 25°C por 30 min, para permitir a permeação da sonda, conforme descrito por Wu *et al.*, (2018).

As amostras foram então submetidas a exposições radiantes crescentes de luz: 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 e 64 J/cm^2 . Imediatamente após cada alíquota, as amostras foram submetidas a leitura em espectrofotômetro leitor de placas SpectraMax M4 (Molecular Devices, USA) utilizando-se espectro de excitação de 504 nm e emissão de 529 nm. A mensuração foi realizada a cada 5 min, totalizando o período de 1 h.

5.9 DETERMINAÇÃO DO TIPO DE REAÇÃO FOTODINÂMICA

Para explorar as contribuições relativas às EROS envolvidas durante a exposição de bactérias a luz azul, exploramos o uso de *quencher* específicos. O íon azida de sódio foi selecionado por ser considerado um potente *quencher* físico do oxigênio singlete molecular ($^1\text{O}_2$), presente na reação fotodinâmica do tipo II (LI *et al.*, 2001). Adicionalmente, para avaliar o potencial envolvimento da formação de radical hidroxila ($\text{HO}^{\bullet-}$), presentes na reação fotodinâmica do tipo I, nós selecionamos como *quencher* a tioureia (KOHANSKI *et al.*, 2007).

Inoculos de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* foram preparados conforme descrito previamente e ajustados à concentração de aproximadamente $1\text{--}2 \times 10^9$ UFC/mL em PBS. As soluções de azida de sódio ou tioureia foram adicionados às suspensões bacterianas na concentração final de 10 mM e 150 μM , respectivamente (LI *et al.*, 2001; KOHANSKI *et al.*, 2007). Subsequentemente, as suspensões bacterianas adicionadas de solução *quencher* (ou apenas mantida em PBS; controle negativo do experimento) foram adicionadas em placas de 12 poços para irradiação. Amostras de *S. aureus* e *E. coli* foram submetidas a exposição radiante de: 0, 45,8, 91,6 e 137,4 J/cm^2 , enquanto amostras de *P. aeruginosa* foram expostas a 0, 22,9, 45,8 e 68,7 J/cm^2 .

Após a exposição a luz azul antimicrobiana, amostras foram submetidas a diluição seriada e foram semeadas em agar para posterior quantificação de unidades formadoras de colônia. Para a obtenção do valor da fração de sobrevivência e análise dos resultados, valores de UFC/mL quantificados foram normalizados pelo valor do respectivo controle não irradiado e submetidos a transformação logarítmica (\log_{10}).

5.10 VERIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS DANOS EM DNA

É conhecido que o estresse oxidativo pode promover quebras na cadeia polimérica de ribose-fosfato do DNA celular (POETSCH, 2020). Dessa forma, para verificar a possível ocorrência de quebras de ligações fosfodiéster na dupla-fita do DNA de bactérias em decorrência à irradiação por luz azul antimicrobiana, utilizou-se o método de eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulse Field Gel Electrophoresis* – PFGE).

As cepas selecionadas, foram preparadas e irradiadas conforme previamente descrito. Os intervalos de exposição radiante avaliados são detalhados na **tabela 2**, comparadas a amostra controle (não irradiada).

Tabela 2 - Exposição radiante de luz azul antimicrobiana utilizados para fotoinativação de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*

| Cepas | Exposição radiante (J/cm ²) | | | | | |
|----------------------|---|------|------|-------|-------|-------|
| <i>P. aeruginosa</i> | 11,4 | 22,9 | 45,8 | 91,6 | 183,3 | 366,6 |
| <i>S. aureus</i> | 22,9 | 45,8 | 91,6 | 183,3 | 366,6 | 549,6 |
| <i>E. coli</i> | 22,9 | 45,8 | 91,6 | 183,3 | 366,6 | 549,6 |

Fonte: dos Anjos (2021)

Após respectivos tratamentos, as amostras foram centrifugadas para descarte do sobrenadante e as células foram ressuspensas em 200 µL de solução tampão TE I (Tris-HCl 10mM, pH 7,5; EDTA 1mM, pH 8,0). Nos grupos referentes as amostras de *S. aureus*, foram adicionadas 2,5 µL de Lisoestafina (L-7386; Sigma, USA) em solução contendo 100 µg/mL em acetato de sódio a 20 mM, pH 4,5. Subsequentemente, alíquotas de 80 µL foram adicionados a 320 µL de agarose para *Pulsed Field* a 1% (55-60 °C), transferidas para moldes (em triplicata) e incubados à 20°C, até a solidificação.

Os *plugs* referentes as amostras das cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa* foram retirados dos moldes e colocados em 5 mL de solução de lise (EDTA 50 mM, pH 8,0; Tris- HCl 50 mM, pH 7,5; SDS 20%, Sarcosil 1%, proteinase K 20mg/mL) (DROPA *et al.*, 2015). Os *plugs* referentes as amostras de *S. aureus* foram acondicionados em solução de lise de diferente constituição (EDTA 100 mM, pH 8,0; Tris HCl 6 mM, pH

7,5; NaCl 1M, SDS 0,2%, Sarcosil 0,5%)(MCDOUGAL *et al.*, 2003). Todas as amostras foram incubadas a 55 °C durante 2 h.

Após a incubação, os *plugs* foram submetidos a duas lavagens em 10 mL de água mili-Q® e quatro lavagens em 10 mL de TE I (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 1mM, pH 8,0), com intervalos de 15 min, a 55 °C. Ao término do procedimento de lavagens, os *plugs* foram transferidos para microtubos tipo Eppendorf®, contendo 1 mL de TE I, e armazenados a 4 °C até o momento do uso.

Para a digestão enzimática, foram utilizadas enzimas de restrição específicas para cada microrganismo: *XbaI*, *BcuI* e *SmaI* para *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, respectivamente. As enzimas de restrição fornecem fragmentos de restrição com peso molecular adequado para a corrida eletroforética e permite a visualização dos perfis moleculares das cepas estudadas (MCDOUGAL *et al.*, 2003). Cada *plug* foi transferido para um novo microtubo contendo 350 µL de respectiva solução tampão adicionado de 10U de enzima. As amostras de *E. coli* e *P. aeruginosa* foram submetidas a banho-maria a 37 °C e as amostras de *S. aureus* foram incubadas a 30 °C, ambas por 18 h.

Em seguida, os *plugs* foram inseridos em gel de agarose para campo pulsado, à 1 % em solução tampão TBE 0,5 X (Tris-borato 45mM, EDTA dissódico 1 mM, pH 8,0), juntamente com o marcador de peso molecular (multimeric phase lambda DNA ladder 48, 5Kb, Bio-rad). Utilizou-se o sistema de eletroforese Chef Mapper (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) sob voltagem de 6 V/cm, a 14 °C, por 22 h, com intervalo de pulsos de 3,51 a 30,82 s. Para leitura, o gel de PFGE foi corado em brometo de etídio 1 µg/mL, durante 1h, e visualizado em luz ultravioleta (Epi Chemi II Darkroom, UVP Bioimaging Systems).

5.11 AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS DANOS OXIDATIVOS EM PROTEÍNAS BACTERIANAS

A oxidação de proteínas é definida como modificações covalentes induzida por espécies reativas de oxigênio. Dentre os produtos mais comuns da oxidação de proteínas estão os derivados carbonil. Quimicamente estáveis, as carbonilas servem como marcadores de estresse oxidativo promovidos pela maioria dos tipos de EROS (PATTISON; RAHMANTO; DAVIES, 2012; FEDOROVA; BOLLINENI; HOFFMANN, 2014). Com o intuito de mensurar possíveis danos oxidativos promovidos pela luz

azul, realizou-se a quantificação de proteínas carboniladas por meio de ensaio fluorimétrico OxiSelect™ STA-307 (Cell Biolabs Inc., EUA).

As cepas avaliadas (*S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*) foram preparados e irradiados de acordo com previamente descrito, utilizando os parâmetros de exposição radiante detalhados na **tabela 2**. Para cada espécie bacteriana e exposição radiante, foram necessárias 12 repetições técnicas para obtenção de quantidade suficiente de proteínas. O *pellet* resultante foi recuperado por meio de centrifugação e então ressuspenso em 60 µl de diluente de amostra do kit OxiSelect™. As amostras foram submetidas a procedimento de lise celular, por meio de desmembrador sônico de sonda (Modelo 100, Fisher Scientific, EUA) em 5 ciclos de sonicação de 5s, com intervalos de 1 min entre os ciclos e mantidas em gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas para remoção de debris. A quantificação de proteínas carboniladas no sobrenadante foram realizadas conforme orientações do fabricante. A leitura foi performada em $\lambda_{ex} = 480$ nm e $\lambda_{em} 530$ nm, por meio de leitora de placas SpectraMax M4 (Molecular Devices, USA).

Paralelamente, mensurou-se a proteína total presente nas amostras por meio do kit colorimétrico BCA Protein Assay (Thermo Scientific, EUA). A mensuração teve por finalidade a normalização do teor de proteínas carboniladas (nmol/mL) pela quantidade de proteína total (mg/mL). O experimento foi realizado em triplicatas independentes.

5.12 AVALIAÇÃO DE POSSÍVEL PROXIDAÇÃO LIPÍDICA BACTERIAS

As espécies reativas de oxigênio são sabidamente conhecidas por gerarem processo de peroxidação lipídica celular. Dentre produtos da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, o malondialdeído (MDA; $C_3H_4O_2$) é o marcador mais comumente conhecido e utilizado (GAWEŁ et al., 2004). Neste estudo, avaliou-se possíveis danos oxidativos lipídicos induzidos pela exposição a luz azul antimicrobiana em *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*.

O cultivo das cepas e preparo dos inoculos foram realizados conforme previamente descrito. As amostras foram expostas a doses de luz azul seguindo exposições radiantes da **tabela 2**. Neste ensaio, utilizou-se o kit comercial OxiSelect™ TBARS (STA-330; Cell BioLabs Inc., EUA). As análises foram performadas

seguindo recomendações do fabricante. Em resumo, neste ensaio o MDA da amostra reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) possibilitando mensuração fluorimétrica da reação, que é comparada a uma curva-padrão de 0 μM a 250 μM de MDA. A leitura foi realizada em leitora de placas SpectraMax M4 (Molecular Devices, USA) em $\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} 590 \text{ nm}$.

5.13 AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS DANOS EM MEMBRANA

Para verificar possíveis danos em membrana bacteriana após a exposição à luz azul antimicrobiana, foram empregados dois métodos: Iodeto de propidium (IP) e N-fenil-1-naftilamina (NFN) (LOH; GRANT; HANCOCK, 1984; ZHU et al., 2014). IP é um fluorocromo que se liga às cadeias do DNA, mas é incapaz de atravessar a membrana citoplasmática íntegra. NPN é uma sonda apolar que apresenta fluorescência em ambientes fosfolipídicos, como a face interna da membrana externa de bactérias Gram-negativas (TRÄUBLE; OVERATH, 1973; LOH; GRANT; HANCOCK, 1984).

O preparo e irradiação de amostras foram realizados conforme previamente descrito, utilizando as exposições radiante especificadas na **tabela 2**. Dois controles comparativos foram incluídos para cada espécie: controle positivo (células lisadas) e controle negativo (amostra não tratadas; células íntegras). Para o controle positivo, o inóculo foi tratado com álcool isopropílico 70% (INGRAM, 1981). Em resumo, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e a amostra ressuspensa em 1 mL de álcool isopropílico 70%, mantidas por 15 min. Após esse período, realizou-se nova lavagem e o *pellet* foi ressuspendido em tampão PBS.

Para o ensaio de permeabilidade de membrana utilizando IP, as amostras foram distribuídas em placas de 96 poços e incubadas com PI (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; BD Pharmingen, EUA) ao abrigo de luz, durante 15 min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro leitor de placas SpectraMax M4 (Molecular Devices, USA) em $\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} 620 \text{ nm}$. De maneira semelhante, para o ensaio da membrana externa as amostras foram incubadas com NPN 15 μM (Sigma Aldrich, EUA). A incorporação de NPN foi mensurada em $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} 415 \text{ nm}$.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

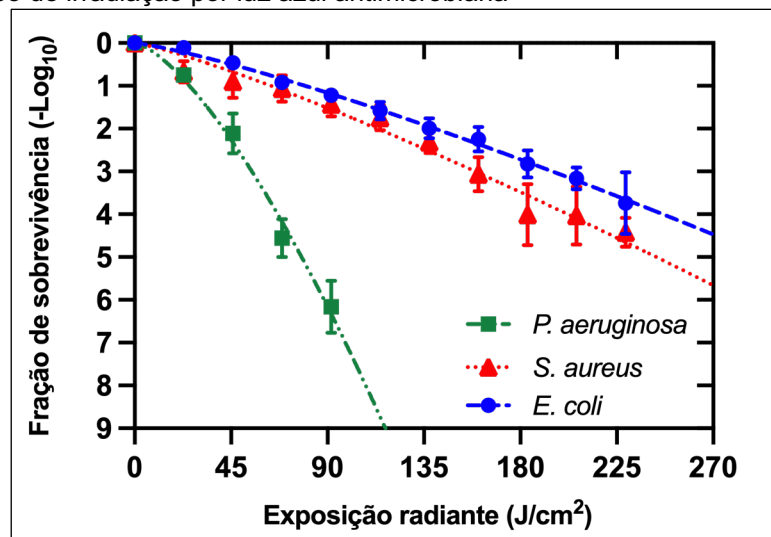
Todas as análises quantitativas foram realizadas em triplicatas independentes. Os dados foram submetidos a análise de variância de uma ou duas vias (One or Two-Way ANOVA) utilizando-se como *post-hoc* o teste de Tukey. As análises foram realizadas por meio do Software Prism 9.0 (GraphPad, USA) adotando-se o nível de significância < 5%.

7 RESULTADOS

7.1 A LUZ AZUL ANTIMICROBIANA FOI EFICAZ CONTRA OS PATÓGENOS TESTADOS

Neste estudo, investigamos a atividade antimicrobiana da luz azul contra *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*. Com base nos nossos dados (**Figura 9**), todas as cepas testadas foram fotoinativadas após exposição a luz azul antimicrobiana, embora apresentem cinéticas distintas, com maior ou menor tolerância à exposição a luz.

Figura 9 - Cinética de inativação de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli* em função do tempo de irradiação por luz azul antimicrobiana



Fonte: dos Anjos (2021)

Por meio da equação de Weibull, modelo matemático adaptado no estudo, foram calculados o melhor valor ajustado para se alcançar a dose letal teórica de 90% (DL₉₀), referente a 1 log₁₀ de redução para cada microrganismo e o fator de resistência R (**Tabela 3**). De acordo com os dados, o fator de tolerância (T) foi maior que 1 (T>1) nas três cepas selecionadas para a padronização do estudo. Os resultados sugerem tendência entre as cepas a apresentar maior tolerância à luz azul antimicrobiana no início do período de exposição. No entanto, as cepas tornam-se mais sensíveis conforme aumenta a exposição radiante. O sucesso do ajuste dos dados pela equação modificada de Weibull foi confirmado, uma vez que todos os valores de R²

ajustado foram superiores a 0,90. Os resultados sugerem forte correlação entre exposição radiante e a taxa de inativação dos patógenos avaliados neste estudo.

Tabela 3 - Média do tempo de inativação bacteriana (min) e erro padrão referentes à dose letal para 90% (DL₉₀), fator de resistência (T) e valor do coeficiente de determinação (R²)

| Microrganismos | Tempo | | Erro padrão | | R ² ajustado |
|----------------------|------------------------|------|------------------------|------|-------------------------|
| | DL ₉₀ (min) | T | DL ₉₀ (min) | T | |
| <i>S. aureus</i> | 27,73 | 1,19 | 3,43 | 0,14 | 0,95 |
| <i>E. coli</i> | 34,74 | 1,22 | 2,54 | 0,18 | 0,96 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 11,18 | 1,44 | 1,64 | 0,10 | 0,98 |

Fonte: dos Anjos (2021)

A partir desses valores calculados, foi possível estimar a dose letal para a inativação de 50 % (DL₅₀), 99,9% (DL_{99,9}) e para esterilização da amostra (DL₁₀₀), considerando-se o inóculo inicial de 1 a 2 x 10⁹ UFC/mL. Os dados encontram-se dispostos na **tabela 4**, onde são exibidas as variáveis tempo (em minutos) e exposição radiante (J/cm²) necessárias para a inativação das cepas testadas. Comparações estatísticas entre as cepas avaliadas são apresentadas na **tabela 5**.

Tabela 4 - Valores de dose letal (DL) estimados a partir do valor ajustado para DL₉₀

| Microrganismos | DL ₅₀ | | DL ₉₀ | | DL _{99,9} | | DL ₁₀₀ | |
|----------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | min | J/cm ² | min | J/cm ² | min | J/cm ² | min | J/cm ² |
| <i>S. aureus</i> | 16 | 36,6 | 28 | 64,1 | 69 | 158,1 | 174 | 398,8 |
| <i>E. coli</i> | 20 | 45,8 | 35 | 80,2 | 85 | 194,8 | 208 | 476,7 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 07 | 16,0 | 11 | 25,2 | 24 | 55,0 | 51 | 116,8 |

Fonte: dos Anjos (2021)

Com base na cinética de inativação de *P. aeruginosa*, para se atingir uma redução de 1 log₁₀ CFU (ou seja, LD₉₀) e 3 log₁₀ CFU (LD_{99,9}), são calculados a exposições radiantes de 25,5 J/cm² e 54,7 J/cm², respectivamente. *S. aureus* apresentou maior tolerância à exposição pela luz azul, comparada a *P. aeruginosa* (P= 0,0001). Da mesma forma, calculamos que para alcançar uma redução de 1 e 3 log₁₀ de CFU em *S. aureus*, são necessários 63,5 J/cm² e 158,9 J/cm², respectivamente. *E. coli* também foi relativamente mais tolerante à exposição a luz azul antimicrobiana quando comparada a *P. aeruginosa* (P<0.0001). Para *E. coli*,

calculou-se exposições radiantes iguais a 79,6 J/cm² e 195,0 J/cm² para atingir 1 e 3 log₁₀ CFU de redução, respectivamente.

Tabela 5 - Comparações de valores de dose letal para inativação de 90 % do inóculo (DL₉₀) obtidos a partir da cinética de inativação média de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli* submetidos à exposição de luz azul antimicrobiana

| Microrganismos | DL ₉₀ | |
|----------------------|------------------|----------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> |
| <i>P. aeruginosa</i> | 0.0001 | <0.0001 |
| <i>E. coli</i> | 0,0157 | - |

Fonte: dos Anjos (2021)

7.2 IMAGENS DE MICROSCOPIA DE TRANSMISSÃO EVIDENCIAM ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS

Neste estudo verificou-se potenciais alterações ultraestruturais e/ou morfológicas induzidas após exposições de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli* à luz azul antimicrobiana. As doses letais calculadas para inativação de 90 e 99.9% de cada cepa foi utilizada no estudo no intuito de padronizar danos às células bacterianas.

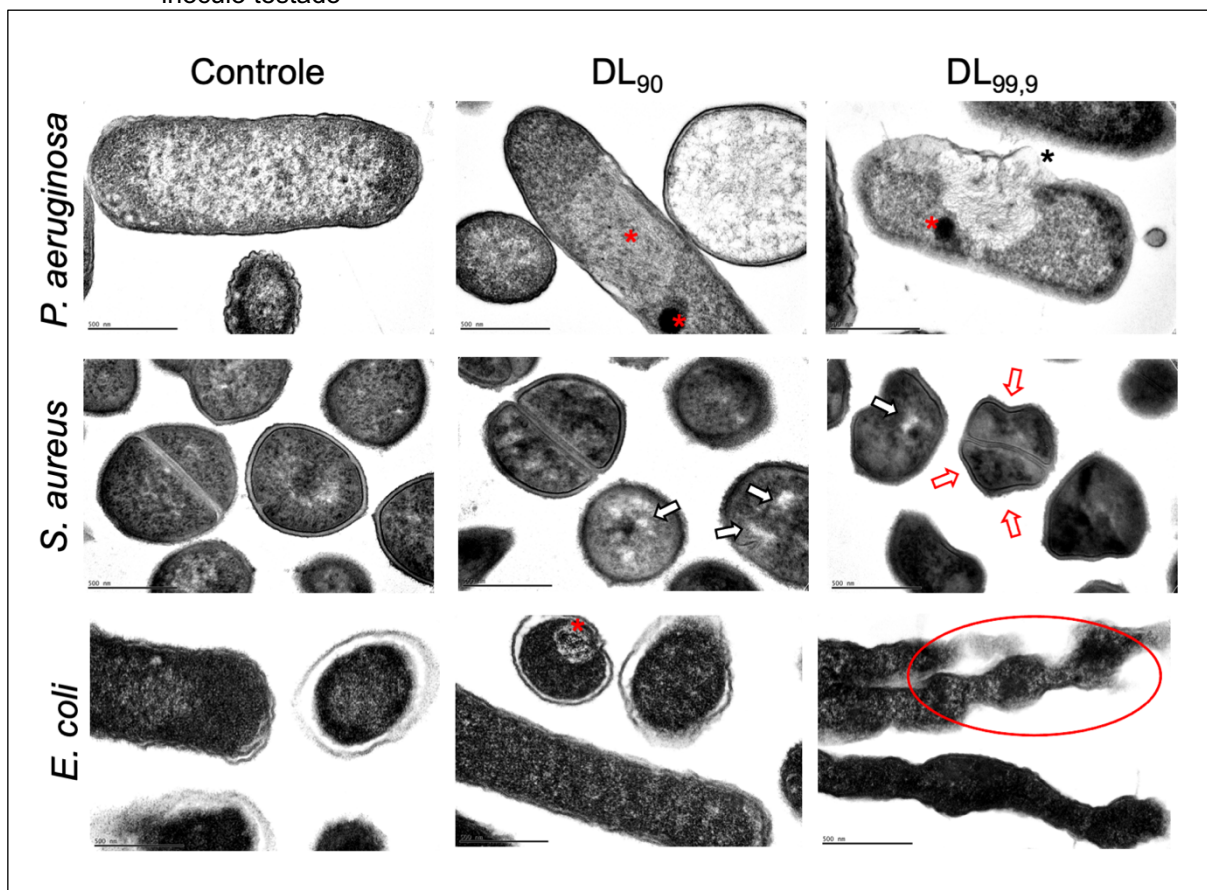
De acordo com imagens representativas apresentadas na **figura 10**, quando *P. aeruginosa* foi submetida a exposição radiante necessária para inativar 90 % do inóculo, evidenciou-se formações densas em conteúdo celular. Essas formações são sugestivas de possível aglutinação do conteúdo intracelular (asterisco vermelho). Quando exposto a uma exposição radiante para atingir LD_{99,9}, observou-se danos significativos em membrana e extravasamento do conteúdo intracelular (asterisco preto).

Com relação a *S. aureus*, após exposição para DL₉₀, evidencia-se formação de vacúolo (seta branca), sugerindo possível dano citoplasmático. Quando *S. aureus* é submetido à exposição de luz azul necessária para DL_{99,9}, observa-se evidente alteração da conformação e morfologia na parede celular (seta vermelha). No entanto, não se evidencia extravasamento celular.

Nas imagens de *E. coli*, após exposição necessária para LD₉₀, observou-se evidente agregação de conteúdo celular (asterisco vermelho). Aumentando a exposição para atingir LD_{99,9}, mudanças morfológicas claras, como alongamento e

irregularidade morfológica, foram observadas, sugerindo danos à membrana celular (área circulado em vermelho).

Figura 10 - Imagens representativas de microscopia de transmissão eletrônica ilustrando danos morfológicos em *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli* induzidos após exposição a doses de luz azul antimicrobiana calculadas para inativação de 90% (DL₉₀) e 99.9% (DL_{99,9}) do inoculo testado



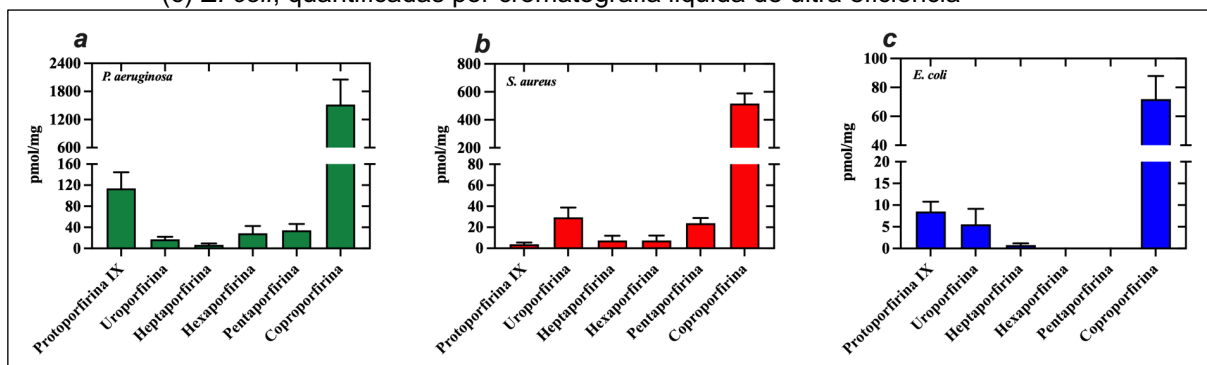
Fonte: dos Anjos (2021)

7.3 PORFIRINAS ENDÓGENAS FORAM IDENTIFICADAS EM TODAS AS BACTÉRIAS TESTADAS

Neste estudo, foram quantificadas as porfirinas endógenas presentes em *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*. Evidenciou-se que todas as espécies carregam concentrações significativas de porfirinas, conforme pode ser observado na **Figura 11 (a, b e c)**. Coproporfirina foi predominantemente quantificada nas três cepas avaliadas. *P. aeruginosa* apresentou maiores concentrações de Coproporfirina (1606.5 ± 564.06 pmol/mg), seguida por *S. aureus* (516.0 ± 72.4 pmol/mg) e *E. coli* (71.9 ± 15.9 pmol/mg). *P. aeruginosa* também demonstrou quantidades significativas de

Protoporfirina IX (PPIX; 113.8 ± 30.68 pmol/mg) e *S. aureus* possui como segunda porfirina em predominância a Uroporfirina (29.5 ± 9.38 pmol/mg).

Figura 11 - Concentrações de porfirinas endógenas presentes em (a) *P. aeruginosa*, (b) *S. aureus* e (c) *E. coli*, quantificadas por cromatografia líquida de ultra eficiência

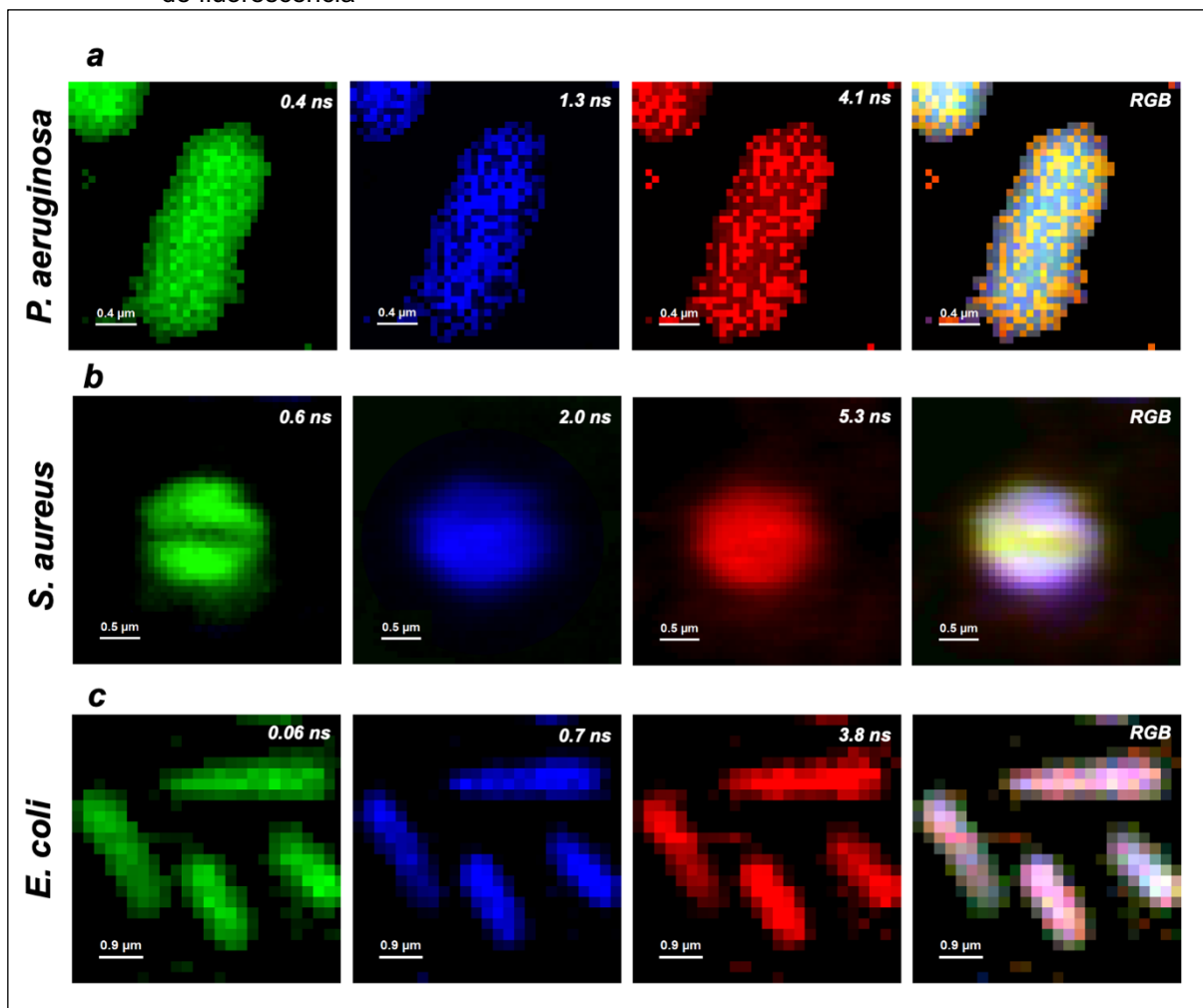


Fonte: dos Anjos (2021)

7.4 MICROSCOPIA CONFOCAL DE IMAGEAMENTO DE TEMPO DE VIDA DE FLUORESCÊNCIA EVIDENCIOU AMPLA DISTRIBUIÇÃO DE MOLÉCULAS ENDÓGENAS FLUORESCENTES

O perfil de distribuição espacial de moléculas endógenas fluorescentes em *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* avaliadas por FLIM são apresentadas na **figura 12**. Os diferentes perfis de decaimento em cada cepa sugerem presença ou interação de diferentes moléculas foto excitáveis com moléculas bacterianas. Embora a ausência de compartimentalização em bactérias não tenha possibilitado a identificação espacial ou interação entre pigmentos endógenos e diferentes estruturas bacterianas, observou-se distribuição homogênea entre espécies fluorescentes em toda área celular. No entanto, em imagem capturada de *S. aureus*, o septo de divisão entre duas células aparece livre das moléculas fluorescentes de menor tempo de decaimento (0.6 ns), enquanto outras moléculas foram identificadas na região de septo. Imagens analisadas de *E. coli* e *P. aeruginosa* não nos permitiram realizar o mesmo tipo de observação.

Figura 12 - Perfil de distribuição espacial de moléculas endógenas fluorescentes em *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* avaliadas por microscopia confocal de imageamento de tempo de vida de fluorescência



Fonte: dos Anjos (2021)

Legenda: Perfil de decaimento demonstrado em nano segundos (ns) e em esquema de cores RGB (red, green, blue e mesclado). Barras de escala representam 0.9 μm

7.5 A EXPOSIÇÃO A LUZ AZUL ANTIMICROBIANA RESULTOU EM SIGNIFICATIVA PRODUÇÃO DE EROS EM TODAS AS BACTÉRIAS TESTADAS

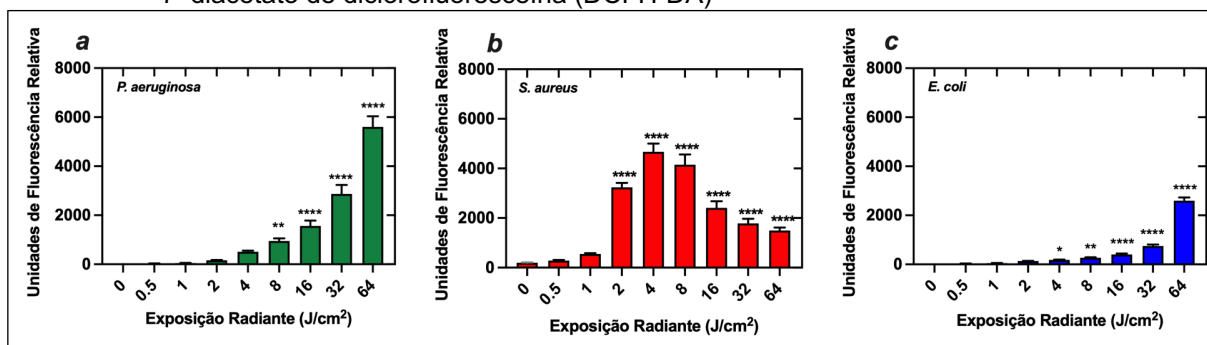
A produção de espécies reativas de oxigênio intracelular após exposição bacteriana por luz azul antimicrobiana em *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli* são exibidas na **figura 13 (a, b e c)**. Após 4 J/cm^2 de exposição a luz azul antimicrobiana, *P. aeruginosa*, observa-se discreto aumento de unidade de fluorescência relativa (UFR; indicando a quantidade de produção de ROS) $508,7 \pm 110,3$ u.a ($P = 0,09$). A produção aumentou significativamente após 16 J/cm^2 de exposição à luz azul

antimicrobiana ($1.555,8 \pm 213,0$ u.a.; $P < 0,0001$), bem como após 64 J/cm^2 ($5.605,9 \pm 308,3$ u.a.; $P < 0,0001$)

Com relação a *S. aureus*, após 2 J/cm^2 de exposição a luz azul já foram observadas um aumento significativo de EROS ($3.235,2 \pm 529,8$ u.a.; $P < 0,0001$). A detecção de EROS atingiu pico de por meio da probe utilizada após 4 J/cm^2 de exposição a luz azul antimicrobiana ($4.670,0 \pm 486,4$ u.a.; $P < 0,0001$). Curiosamente, após aumento da exposição radiante para 16 J/cm^2 , houve redução dos valores mensurados, embora ainda significativamente diferente ao valor basal celular ($2.407,2 \pm 165,0$ u.a.; $P < 0,0001$). O mesmo fenômeno foi observado após 64 J/cm^2 , com valores mensurados decrescentes ($1.498,0 \pm 79,6$ u.a.; $P < 0,0001$).

E. coli, no entanto, demonstrou uma menor produção de EROS quando comparada as outras espécies testadas (*P. aeruginosa* e *S. aureus*). Não houve detecção significativa após 2 J/cm^2 de exposição a luz azul ($133,8 \pm 30,1$ u.a.; $P = 0,1$). Após 4 J/cm^2 houve discreto aumento da produção ($183,4 \pm 48,9$ u.a.; $P = 0,02$) apenas sendo detectado aumento significativo após 16 J/cm^2 ($402,7 \pm 134,4$ u.a.; $P < 0,0001$). Após 64 J/cm^2 , maior exposição radiante testada, detectou-se aumento significativo de EROS intracelular ($2.600,0 \pm 470,3$ u.a.; $P < 0,0001$). No entanto, o valor total mensurado após 64 J/cm^2 representa 0,57 e 2,15 vezes inferiores aos valores detectados em *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente.

Figura 13 - Produção de espécies reativas de oxigênio intracelular em *P. aeruginosa* (a), *S. aureus* (b) e *E. coli* (c) após exposição à luz azul antimicrobiana mensurada pelo marcador $2'$, $7'$ -diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA)



Fonte: dos Anjos (2021)

Legenda: Os valores são apresentados como média \pm SEM. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ em comparação com o controle não tratado

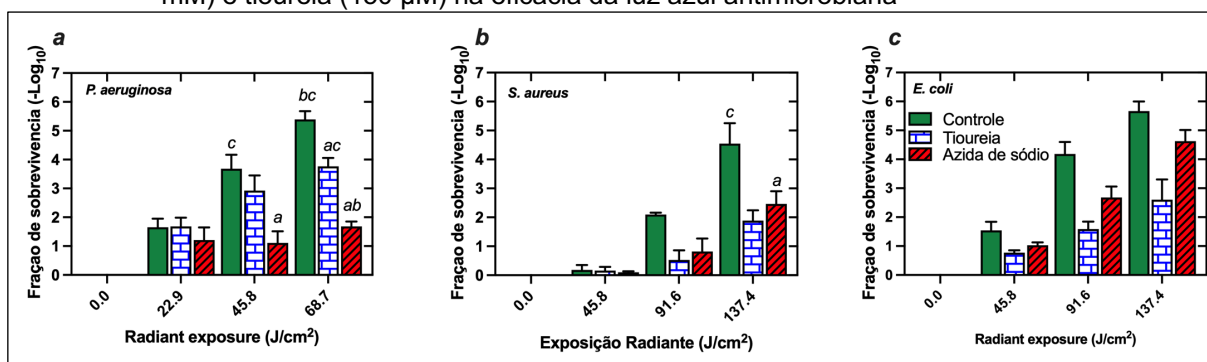
7.6 RADICAL HIDROXILA E OXIGÊNIO SINGLETO CONTRIBUEM PARA A AÇÃO ANTIMICROBIANA DA LUZ AZUL ANTIMICROBIANA

Neste estudo avaliamos a contribuição do oxigênio singleto e dos radicais hidroxila na eficácia da luz azul antimicrobiana contra de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Conforme demonstrado na **figura 14 (a, b e c)**, em presença de azida de sódio a eficácia da luz azul antimicrobiana foi significativamente reduzida contra *P. aeruginosa* ($P = 0,002$). Após $68,7 \text{ J/cm}^2$ observou-se redução de apenas $1,68 \pm \log_{10}$ CFU para amostras suspensas em NaN_3 e $3,76 \pm 0,50 \log_{10}$ quando suspensas em tioureia. Em contraste, amostra controle de *P. aeruginosa* alcançou $5,38 \pm 0,49 \log_{10}$ CFU de redução.

Com relação *S. aureus*, apenas foram observadas diferenças estatísticas entre o controle e amostras suspensas em NaN_3 após exposições de $137,4 \text{ J/cm}^2$ ($2,46 \pm 0,75 \log_{10}$ vs. $4,54 \pm 1,22 \log_{10}$; $P = 0,04$). Embora amostras suspensas em tioureia também tenham apresentado efeito fotoprotetor (redução de $1,88 \pm 0,61 \log_{10}$ CFU ou 2,41 vezes menos eficiente em comparação com o controle), não houve diferença estatística.

De forma similar, amostras de *E. coli* suspensas NaN_3 e tioureia apresentaram respectivamente $4,63 \pm 0,57 \log_{10}$ e $2,60 \pm 1,21 \log_{10}$ de eficácia comparados com o controle ($5,67 \pm 0,57 \log_{10}$). O efeito fotoprotetor da tioureia tornou a luz azul antimicrobiana 2,18 vezes menos eficiente contra *E. coli*, sugerindo a importância produção de radical durante a ação fotodinâmica.

Figura 14 - Efeitos supressores de espécies reativas de oxigênio produzidos por azida de sódio (10 mM) e tioureia (150 μM) na eficácia da luz azul antimicrobiana



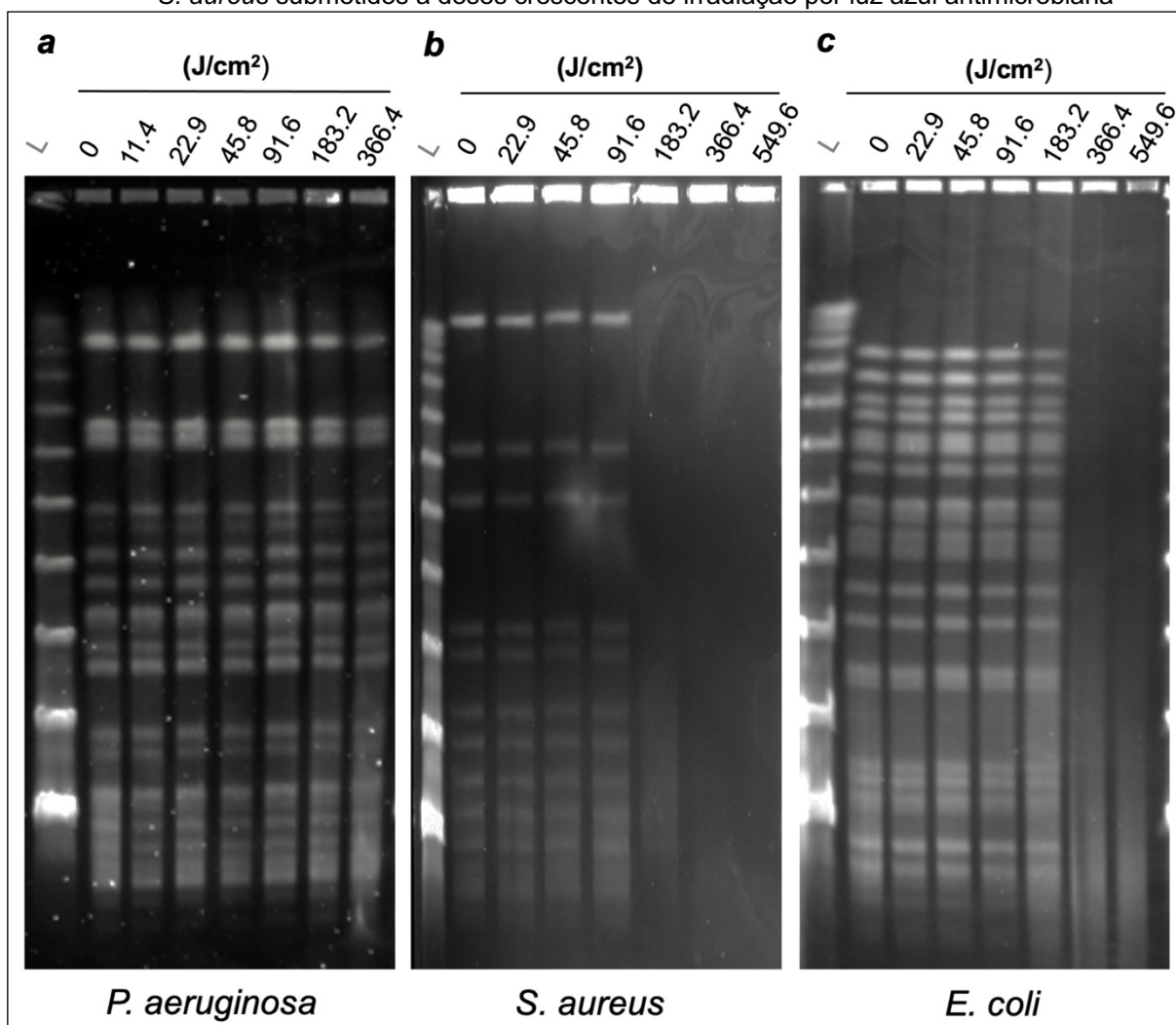
Fonte: dos Anjos (2021)

Legenda: Em (a) *P. aeruginosa*, (b) *S. aureus* e (c) *P. aeruginosa*. Os valores são apresentados como média \pm SEM

7.7 A LUZ AZUL ANTIMICROBIANA INDUZIU DANOS AO DNA DE *S. AUREUS* E *E. COLI*, MAS NÃO INDUZIU DANOS EM *P. AERUGINOSA*

Neste estudo, testamos a hipótese de que a exposição a luz azul antimicrobiana induziria danos ao DNA de bactérias. Dessa forma, após doses crescentes de exposição a luz azul antimicrobiana, avaliamos a degradação do DNA em *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli* (Figura 15a, b e c) por meio de definição de bandas de PFGE.

Figura 15 - Análise de danos em DNA por meio de eletroforese em (a) *P. aeruginosa*, (b) *E. coli* e (c) *S. aureus* submetidos a doses crescentes de irradiação por luz azul antimicrobiana



Fonte: dos Anjos (2021)

Legenda: Na figura são evidenciados padrões de bandas de eletroforese em gel de campo pulsado.

Nossos resultados não evidenciaram danos ao DNA de *P. aeruginosa*, mesmo após 366,4 J/cm², dose três vezes maior do que a calculada para completa

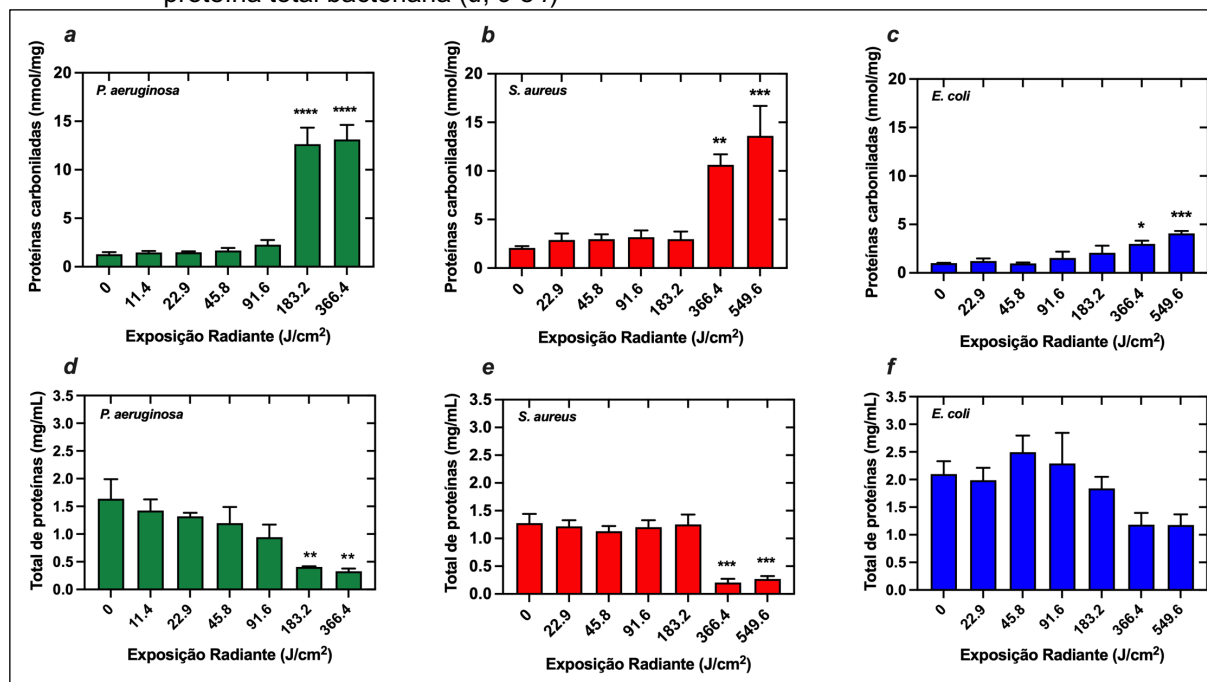
esterilização do inoculo bacteriano testado ($LD_{100} = 117,2 \text{ J/cm}^2$). No entanto, com relação a *S. aureus*, após exposição radiante a luz azul antimicrobiana $\geq 183,2 \text{ J/cm}^2$, evidenciou-se perda no padrão de banda do PFGE, sugerindo degradação do DNA cromossômico. De acordo com valores de dosimetria estimadas, essa dose seria suficiente para redução de mais de $3 \log_{10}$ CFU do inoculo inicial testado ($LD_{99,9} = 158,99 \text{ J/cm}^2$). Com relação a *E. coli*, também foi evidenciado perda do padrão de bandas do PFGE, embora o resultado sugira maior tolerância ao dano quando comparado a *S. aureus*. Após doses $\geq 366 \text{ J/cm}^2$ de exposição a luz azul antimicrobiana, suficientes para redução de $5 \log_{10}$ do inoculo inicial ($LD_{99,9999} = 343,3 \text{ J/cm}^2$), evidenciou-se padrão de “esfregaço”, sugerindo quebras em DNA.

7.8 PROTEÍNAS BACTERIANAS SÃO SUSCETÍVEIS À DEGRADAÇÃO APÓS ALTAS DOSES DE EXPOSIÇÃO À LUZ AZUL ANTIMICROBIANA

Neste estudo, testamos a hipótese de que a luz azul antimicrobiana induziria danos às proteínas em bactérias. Dessa forma, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli* foram submetidos exposições radiantes crescentes de luz azul antimicrobiana, seguida por quantificação do total de proteínas e proteínas carboniladas em cada cepa. De acordo os resultados demonstrados na **figura 16 (a, b, c, d, e e f)**, apenas foram observados a relação inversamente proporcional entre proteína total e proteínas carboniladas após altas doses de exposição radiante.

Evidenciou-se aumento significativo na concentração de proteínas carboniladas em *P. aeruginosa* somente após $183,2 \text{ J/cm}^2$ de aBL ($P < 0,0001$). Esta dose representa exposição radiante maior do que a estimada para erradicação completa do inoculo testado ($LD_{100} = 117,0 \text{ J/cm}^2$). Com relação a *S. aureus* e *E. coli*, observou-se ainda maior tolerância, com aumento significativo nas concentrações de proteínas carboniladas somente após $366,4 \text{ J/cm}^2$ ($P = 0,002$ e $P = 0,02$, respectivamente). Esta dose representa dosimetria acima ao valor estimado para redução de $5 \log_{10}$ e $8 \log_{10}$ de *E. coli* e *S. aureus*, nesta ordem.

Figura 16 - Efeitos da exposição à luz azul antimicrobiana em proteínas de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*, avaliados por meio da quantificação das proteínas carboniladas (a, b e c) e proteína total bacteriana (d, e e f)



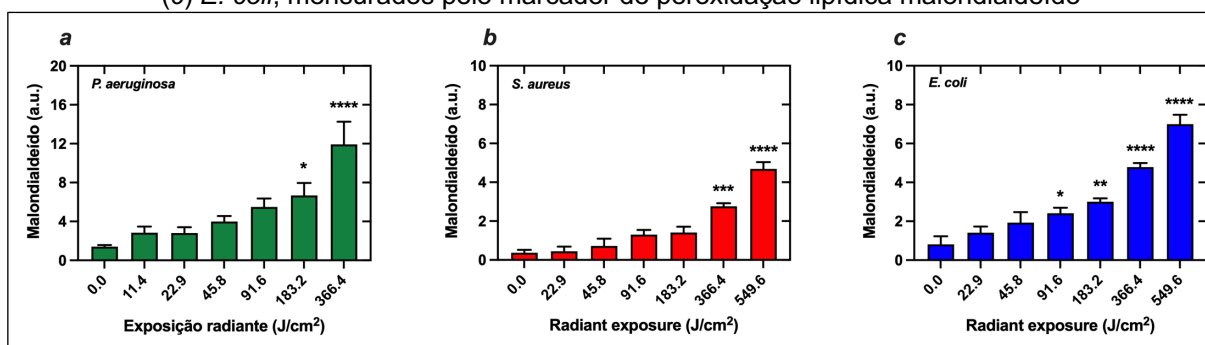
Fonte: dos Anjos (2021)

Legenda: Os valores são apresentados como média \pm SEM. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, $P < 0,0001$ em comparação com o controle não tratado

7.9 A EXPOSIÇÃO POR LUZ AZUL ANTIMICROBIANA INDUZIU PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM *P. AERUGINOSA*, *S. AUREUS* E *E. COLI*

Neste estudo, objetivou-se determinar possível oxidação lipídica bacteriana induzida pela exposição a luz azul antimicrobiana. Com relação as três espécies bacterianas avaliadas, foram observadas quantidades crescentes de malondialdeído, o marcador de peroxidação lipídica testado (**Figura 17a, b e c**). No entanto, nossos resultados evidenciam alta tolerância à exposição por luz azul antimicrobiana, tornando necessário altas exposições radiantes para detecção de danos lipídicos. Após 183,2 J/cm² de exposição de luz azul antimicrobiana, observou-se aumento de 4,75 vezes ($P = 0,02$) do marcador malondialdeído em amostras de *P. aeruginosa*. Em contraste, utilizando a mesma exposição radiante em *E. coli*, observou-se aumento de 3,5 vezes nos níveis mensurados ($P = 0,04$), atingindo aumento de 8,7 vezes após 549.6 J/cm² ($P < 0,001$). Com relação a *S. aureus*, observou-se aumento significativo após 366.4 J/cm² (7,6 vezes; $P < 0,001$), alcançando valores 13 vezes mais altos de malondialdeído após 549.6 J/cm² ($P < 0,001$).

Figura 17 - Efeitos da luz azul antimicrobiana sobre os lipídios de (a) *P. aeruginosa*, (b) *S. aureus* e (c) *E. coli*, mensurados pelo marcador de peroxidação lipídica malondialdeído



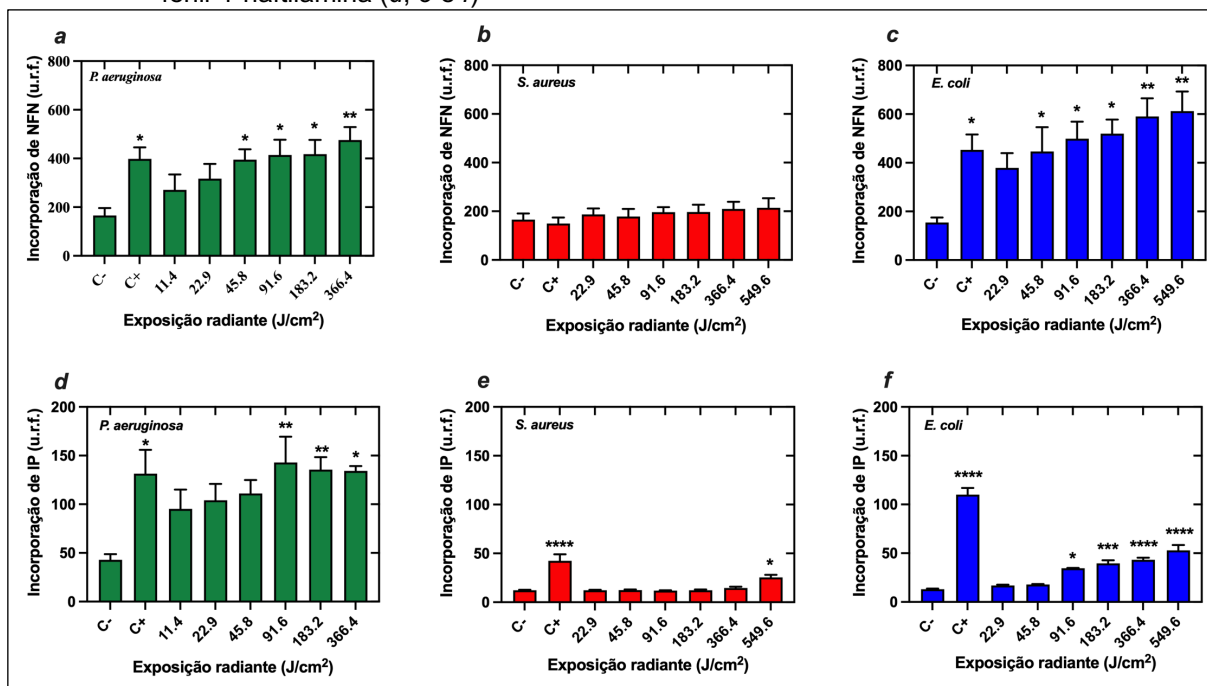
Fonte: dos Anjos (2021)

Legenda: Os valores são apresentados como média \pm SEM. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, $P < 0,0001$ em comparação com o controle não tratado

7.10 A LUZ AZUL ANTIMICROBIANA INDUZIU PERMEABILIZAÇÃO DE MEMBRANA EM *P. AERUGINOSA* E *E. COLI*, MAS NÃO INDUZIU PERMEABILIZAÇÃO EM *S. AUREUS*

Neste estudo, avaliou-se alterações na integridade de membrana bacteriana em *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*, utilizando IP e NPN. De acordo com a **figura 18 (a, b e c)**, observa-se aumento significativo na incorporação de NPN após 45,8 J/cm² de exposição a luz azul antimicrobiana em *P. aeruginosa* e *E. coli*, ($P < 0,01$), sugerindo possível danos à membrana externa dos patógenos avaliados. De maneira semelhante, ao avaliarmos a incorporação de IP, molécula que se torna fluorescente quando intercalada ao DNA, observou-se aumento significativo para ambas as espécies após exposição radiante de 91,6 J/cm² ($P < 0,01$). Interessantemente, apenas foi observado incorporação de IP em *S. aureus* após 549,6 ($P < 0,05$), dose superior a calculada para completa esterilização da amostra ($LD_{100} = 397,7$ J/cm²). Embora a probe NPN também tenha sido testado em *S. aureus*, devido às diferenças estruturais em membrana Gram-positiva, não é considerado adequado.

Figura 18 - Efeitos da luz azul antimicrobiana sobre permeabilização de membrana em *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*, avaliados por meio incorporação de iodeto de propídio (a, b e c) e N-fenil-1-naftilamina (d, e e f)



Fonte: dos Anjos (2021)

Legenda: Os valores são apresentados como média \pm SEM. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ em comparação com o controle negativo (C-). Controle positivo (C+) representam células lisadas.

8 DISCUSSÃO

Neste estudo foram testadas as hipóteses que envolvem os mecanismos de morte de bactérias mediada por luz azul. De acordo com dados disponíveis na literatura, são sugeridos que danos promovidos pela exposição bacteriana por luz azul antimicrobiana resultariam em destruição de alvos bacterianos não específicos (ASHKENAZI et al., 2003; DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009; DAI et al., 2012; YIN et al., 2013; WANG et al., 2017a). Dessa forma, macromoléculas bacterianas seriam danificadas como resultado da interação com EROS, produzidas a partir da ação excitatória da luz sobre pigmentos endógenos fotoativos (WANG et al., 2017a; WU et al., 2018; HYUN; MOON; LEE, 2021). Portanto, neste estudo foram monitorados danos promovidos pela luz em diferentes estruturas bacteriana como DNA e membrana, além de uma série de biomoléculas bacterianas como EROS, proteínas e lipídeos. Também foram realizadas a identificação e quantificação das porfirinas endógenas bacterianas.

Isto posto, para analisar a diversidade de possíveis danos estruturais, foram selecionadas três espécies bacterianas representativas: *S. aureus*, o representante Gram-positivo; *E. coli* o representante Gram-negativo; e *P. aeruginosa*, um microrganismo Gram-negativo com cápsula mucoide. Adicionalmente é importante ressaltar que essas espécies também apresentam relevância clínica, estando diretamente envolvidas com infecções em humanos e animais, bem como associadas a inúmeros casos de resistência antimicrobiana (BOUCHER et al., 2009; PENDLETON; GORMAN; GILMORE, 2013).

De imediato, durante a padronização das curvas de inativação foram observadas a eficácia da luz azul antimicrobiana contra as espécies testadas, corroborando com a literatura prévia (DOS ANJOS et al., 2019b; SABINO et al., 2019; LEANSE et al., 2020b). Conforme já reportado anteriormente, neste estudo também foram observadas diferenças marcantes em relação a tolerância à luz azul entre as espécies avaliadas (SABINO et al., 2019; DOS ANJOS et al., 2020a). Especificamente, foram evidenciados maior tolerância em *S. aureus* e *E. coli*, quando comparadas a *P. aeruginosa*.

De acordo com a literatura mais ampla acerca de mecanismo de ação, pigmentos bacterianos endógenos (como porfirinas) seriam apontados como responsáveis pelo mecanismo de ação antimicrobiano (HAMBLIN et al., 2005;

PLAVSKII et al., 2018; WANG et al., 2019a; BUMAH et al., 2020a). Ao serem excitados pela luz azul esses cromóforos produzem EROS, que em interação com estruturas celulares causam danos oxidativos, resultando em morte bacteriana (HAMBLIN et al., 2005; DAI et al., 2013; PLAVSKII et al., 2018; BUMAH et al., 2020). Nesse sentido, potencial explicação para a variável tolerância entre as espécies estaria associada às diferentes concentrações de porfirinas intracelulares.

Por certo, altas concentrações de porfirinas presentes em *P. aeruginosa*, em relação a *S. aureus* ou *E. coli*, poderiam explicar a maior sensibilidade a luz azul antimicrobiana. No entanto, curiosamente a concentração de porfirina em *S. aureus* foi apenas 34% inferior às porfirinas mensuradas em *P. aeruginosa*. Quando comparado a *E. coli*, foram observadas concentrações 95% inferiores as mensuradas em *P. aeruginosa*. Embora tenham sido observadas tolerância/cinética de inativação semelhantes entre *S. aureus* e *E. coli*, a concentração de porfirina entre as cepas difere em 6,7 vezes. Este fato pode sugerir que a tolerância a luz azul antimicrobiana possa não estar ligado somente às concentrações de porfirinas endógenas.

De fato, estudo realizado por Leanse et al., (2020) apontou a presença do poderoso antioxidante estafiloxantina, pigmento carotenóide encontrado na membrana de *S. aureus*, como responsável pela maior tolerância a exposição a luz azul antimicrobiana. Dessa forma, é provável que embora a concentração de porfirina seja um fator importante para a eficácia da luz azul antimicrobiana, outros fatores como a presença ou expressão de moléculas antioxidantes podem ser igualmente relevantes.

Ao investigarmos a produção de EROS após diferentes exposições a luz azul antimicrobiana contra *P. aeruginosa*, notou-se um aumento dose dependente em relação ao controle não tratado. Curiosamente, com relação ao *S. aureus*, notou-se um aumento inicial acentuado da produção de EROS após 4 J/cm² (cerca de 24 vezes em relação ao controle). No entanto, em exposições radiantes mais altas, como 16 J/cm² e 64 J/cm², houve uma redução na produção de EROS (12 e 7 vezes respectivamente e em relação ao controle). Uma possível explicação poderia ser atribuída atividade antioxidante exercida pela estafiloxantina presente em *S. aureus*, embora os dados deste estudo não nos permitam afirmar esse fenômeno. Com relação a *E. coli*, observou-se mudanças menos proeminentes na produção de EROS. Isto posto, a menor quantidade de porfirinas presentes em *E. coli* poderiam ser associadas a menor produção de EROS em comparação a *P. aeruginosa*.

Neste estudo também foram investigados o equilíbrio entre o tipo I e tipo II de produção de EROS promovidos pela exposição a luz azul e sua relação com a eficiência antimicrobiana. Nossos resultados evidenciaram perceptível discrepância na fração de sobrevivência de *P. aeruginosa* suspensa em azida, quando comparada as amostras controle ou suspensas em tioureia. Considerado *quencher* físico do oxigênio singlete molecular (LI et al., 2001), o efeito protetor da azida torna possível pressupor que o principal mecanismo de fotoinativação para a *P. aeruginosa* envolva o mecanismo tipo II. Embora menos evidente, tioureia também demonstrou efeito fotoprotetor, indicando potencial envolvimento do radical hidroxila durante a fotoinativação de *P. aeruginosa*.

Em contrapartida, foi possível notar que *S. aureus* e *E. coli* não evidenciaram discrepância entre o uso de ambos os bloqueadores utilizados. Dessa forma, pode-se especular a existência de um mecanismo compensatório entre as reações fotodinâmicas tipo I e II nestas espécies. De acordo com a literatura, as EROS formadas via mecanismo do tipo I ou II são extremamente reativas e interagem fortemente com uma variedade de biomoléculas bacterianas (WAINWRIGHT, 1998; COSTA et al., 2013). No entanto, devido a alta reatividade e meia-vida curta, acredita-se que apenas moléculas adjacentes à produção de EROS são afetadas diretamente.

Embora nossas análises tenham evidenciado a distribuição de moléculas fluorescentes nas espécies bacterianas avaliadas, a ausência de compartimentalização dessas células não possibilitou a identificação de interações ou proximidades com macromoléculas estruturais. No entanto, interessante a imagem capturada de *S. aureus* evidenciou ausência de ao menos uma das espécies fluorescentes em região de septo de divisão celular, possibilitando a visualização e delimitação entre membrana e citoplasma. A imagem pode sugerir maior distribuição de moléculas fluorescentes em região de citoplasma, conforme possibilitou observar em *S. aureus*, embora nossos dados não nos possibilitem confirmar essa hipótese.

Acerca das alterações morfológicas em *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli* após exposições riantes necessárias para DL₉₀ e DL_{99,9}, foram evidenciadas mudanças ultra estruturais significativas. Como alteração comum às três cepas avaliadas, foram observadas potencial alteração em conteúdo citoplasmático e possíveis danos em parede celular. Em particular, após a maior dose testada (LD_{99,9}), evidenciou-se possível desestabilização da membrana celular em *S. aureus*. Com relação a *P. aeruginosa*, observou-se destruição completa da membrana bacteriana, associada a

extravasamento de conteúdo intracelular. A respeito de *E. coli*, foram observados alongamento das células bacterianas e danos sugestivos de destruição de membrana. Todas essas observações estão de acordo com o esperado após uma intervenção terapêutica que visa a membrana celular. Como exemplo, Grigor'eva *et al.* (2020) observaram alterações morfológicas semelhantes em *S. aureus* e *E. coli* ao avaliarem mudanças ultra estruturais promovidos por peptídeos catiônicos e clorexidine.

Estudo realizado por Wu e colaboradores (2018) também evidenciaram danos em membrana em *S. aureus* expostos a luz azul antimicrobiana. Por meio de imagens de microscopia de força atômica, os autores observaram que células irradiadas em doses sub letais apresentaram maior rugosidade em membrana. Os danos seriam seguidos de extravasamento de conteúdo, confirmados por mensuração de taxa de perdas de íon potássio para meio extracelular. Segundo os autores, o aumento do vazamento de K^+ poderia indicar desnaturação da proteína transmembrana da bomba de Na^+/K^+ , essenciais em mecanismos de permeabilização de membrana. Os danos seriam então seguidos por lise e morte celular.

Por conseguinte, a confirmação e mensuração de possíveis danos em membrana bacteriana foram acessadas neste estudo. Nossos resultados evidenciaram que doses subletais (ou seja, exposições necessárias para inativação de 99,9% das bactérias testadas) promoveram aumento significativo na permeabilidade/integridade da membrana celular em *P. aeruginosa* e *E. coli*. No entanto, o mesmo fenômeno não foi observado em *S. aureus*. É possível que a luz azul antimicrobiana tenha induzido apenas alterações de conformação da membrana Gram positiva, mas não tenha promovido aumento de permeabilização. No entanto, Dong e colaboradores(2019) bem como Hui e colaboradores (2020) observaram que a luz azul ($\lambda=460$ nm) ao promover fotolise da estafiloxantina, presente na membrana bacteriana de *S. aureus*, provocou alterações em membrana, tornando-a mais permeável a diferentes moléculas antimicrobianas.

Uma possível explicação para a divergência entre nossos resultados e o de estudos anteriores poderia ser atribuída a limitação proporcionada pelas sondas utilizadas. A probe NFN extensivamente utilizada em estudos que avaliam a permeabilidade da membrana externa de bactérias Gram-negativas (LOH; GRANT; HANCOCK, 1984; HELANDER; MATTILA-SANDHOLM, 2000). No entanto, seu uso como ferramenta de avaliação de permeabilidade de membrana em *S. aureus* foi incompatível. Adicionalmente, embora tenha sido observado aumento da

incorporação de IP após 549 J/cm² (dose capaz de esterilizar por completo a amostra) é importante ter em mente que esta probe precisa atravessar a membrana bacteriana por completo para se ligar-se ao DNA (ROSENBERG; AZEVEDO; IVASK, 2019). Dessa forma, o IP possibilita a sinalização de maiores danos estruturais a membrana, no entanto pode não ser um bom indicador na avaliação de danos estruturais de menor dimensão.

No entanto, sabe-se que dentre todos os componentes celulares susceptíveis a ação de EROS, a membrana é um dos mais acometidos. Devido a sua constituição lipídica, a reatividade com EROS desencadeiam alterações de estrutura e permeabilidade (FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, 1997). Neste sentido, nossos resultados evidenciaram um aumento dose dependente nas concentrações de malondialdeído nas três espécies avaliadas, como resultado da peroxidação lipídica induzida pela luz azul. Nossas observações estão de acordo com estudos prévios, que também verificaram o aumento das concentrações de MDA em *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *P. fluorescens* e *E. coli*. Isso sugere que a peroxidação lipídica seja um dano oxidativo comum entre bactérias Gram-positivo e negativo expostas a luz azul (WU *et al.*, 2018; HYUN; LEE, 2020).

WU e colaboradores (2018) analisaram o perfil de ácidos graxos pré e pós exposição a luz azul antimicrobiana e encontraram alterações distintas em composição e conteúdo relativo. Segundo os autores, os ácidos graxos insaturados foram mais acometidos por danos oxidativos quando comparados aos saturados. Considerando que a maioria dos ácidos graxos insaturados estão localizados na membrana bacteriana (PARSONS; ROCK, 2013), o aumento das concentrações de malondialdeído podem justificar os danos em membrana observados. Adicionalmente, é importante salientar que o aumento da permeabilidade de membrana pode ser determinante na diminuição de patogenicidade e susceptibilidade do microrganismo, dessa forma possibilitando sua associação com outras terapias antimicrobianas.

Com relação a possíveis danos em DNA, o estudo evidenciou que diferentes espécies podem divergir na magnitude de comprometimento em estruturas bacterianas, podendo ou não apresentar danos ao material genético. Ao avaliarmos *S. aureus* e *E. coli*, foram observadas degradação de DNA após 183,3 e 366,4 J/cm², respectivamente. Essas exposições radiantes são suficientes para a fotoinativação de mais de 99.9% de ambas as bactérias. No entanto, surpreendentemente não foram observadas evidências de degradação do DNA de *P. aeruginosa*, mesmo após 366.4

J/cm² de exposição a luz azul. Estas exposições radiante representam valores acima ao estimado para inativação de 100% do inóculo, conforme determinado teoricamente por meio de equação de Weibull (SABINO et al., 2019).

Uma provável hipótese para o ocorrido estaria associada a baixa tolerância de *P. aeruginosa* a luz azul antimicrobiana. Considerando o DNA como uma molécula resistente, é provável que uma maior exposição a EROS seja necessária para provocar danos perceptíveis ao teste. No entanto, conforme foi evidenciado nas imagens de microscopia, após doses de 55 J/cm² já foram observados ruptura de membrana bacteriana e extravasamento de conteúdo (incluindo material genético), podendo ter mitigado a ocorrência do dano em DNA de *P. aeruginosa*. Neste caso, as exposições radiantes mais altas necessárias para a inativação de *E. coli* e *S. aureus* possivelmente tenha permitido maior exposição do material genético às EROS intracelular, acarretando em degradação do DNA.

Embora proteínas bacterianas sejam alvos em potencial para a luz azul antimicrobiana, evidências ainda não haviam sido demonstradas na literatura. Dessa forma, este estudo apresentou as primeiras confirmações para essa hipótese. De fato, foram constatados que a luz azul antimicrobiana tem ação sobre proteínas bacterianas. No entanto, exposições radiantes relativamente altas foram necessárias para que houvesse detecção de alteração, sugerindo que este possa ser um alvo bacteriano secundário.

Interessantemente, estudo realizado por Sabino (2021) demonstrou que a terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno ocasionou danos oxidativos em proteínas bacterianas. Ao evidenciar forte tendência dose dependente entre danos em proteínas e a cinética de inativação bacteriana, o autor sugeriu que danos oxidativos em proteína seja a causa primária de morte bacteriana. Possivelmente a permeabilidade do fotossensibilizador exógeno e sua distribuição/proximidade com as proteínas bacterianas tenha favorecido o fenômeno. Nesse sentido, pode-se hipotetizar que o acometimento tardio de proteínas bacterianas expostas a luz azul pode estar associado a localização espacial de porfirinas endógenas.

Embora este estudo ainda apresente lacunas, alguns aspectos que envolvem a atividade antimicrobiana promovidos pela luz azul foram confirmados. Essas informações, associadas aquelas presentes na literatura, tornam encorajadoras a possibilidade da utilização da luz azul em combinação com outras terapias antimicrobianas.

Estudos realizados pelo nosso grupo já evidenciaram que a luz azul antimicrobiana demonstra eficácia independente da expressão de resistência antimicrobiana ou fatores de virulência expressos por bactérias (DOS ANJOS et al., 2019b, 2020b). Assim como foram evidenciados os efeitos inibitórios da luz azul antimicrobiana contra a atividade de β -lactamases (DOS ANJOS et al., 2020b). Hui e colaboradores (2020) demonstraram que a exposição a luz azul antimicrobiana permitiu a difusão passiva de antibióticos pela membrana de *S. aureus*. O fenômeno foi confirmado após observarem aumento da permeabilidade de membrana pós exposição a luz. Wozniak e colaboradores (2019), observaram resultados promissores entre a associação de antibióticos convencionais e luz azul contra *A. baumannii* multirresistente. Os autores atribuíram os resultados ao aumento significativo da produção de EROS na terapia combinada. O aumento da produção seria resultado do efeito aditivo entre a produção de EROS promovida pelo antibiótico, associada a produção de EROS pela exposição a luz.

Esses estudos subsidiam a possibilidade do uso da luz azul antimicrobiana em possível combinação com outros agentes antimicrobianos. Dessa forma, as evidências mecanicistas demonstradas sistematicamente pela primeira vez poderão impulsionar testes de novas combinações sinérgicas, baseadas nas alterações estruturais observadas. Por fim, a luz azul antimicrobiana poderia se tornar a nova “bala mágica” possibilitando tratamentos até mesmo de patógenos resistentes, tornando antibióticos efetivos novamente.

9 CONCLUSÕES

Neste estudo foram testados pela primeira vez, e de maneira sistemática, hipóteses a cerca dos alvos bacterianos acometidos pela atividade antimicrobiana da luz. Nossos resultados evidenciaram a eficácia da terapia nas três espécies bacterianas avaliadas. No entanto, foram demonstradas tolerância variável entre as cepas, potencialmente resultantes da concentração de porfirinas e/ou expressão de antioxidantes. Nossos resultados mostraram que doses subletais de luz azul podem promover danos à membrana bacteriana, sugerindo fortemente que este seja o alvo primário de ação antimicrobiana. A degradação em DNA foi evidenciada em *S. aureus* e *E. coli*, porém não foram identificados danos em *P. aeruginosa*, evidenciando particularidades entre diferentes espécies tratadas. Adicionalmente foram constatados danos oxidativos em membrana bacteriana e lipídios, no entanto essas alterações apenas foram observadas após altas doses de exposição radiante, sugerindo que esses não sejam alvos primários da ação antimicrobiana promovido pela luz azul.

REFERÊNCIAS

- AL-SHAMMARY, A. A. K. *et al.* Bactericidal effects of *in vitro* 405 nm, 530 nm and 650 nm laser irradiation on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Mycobacterium fortuitum*. **Lasers in Dental Science**, v. 4, n. 3, p. 111–121, 2020.
- AL HAMZI, M. A. *et al.* Phototoxic effect of visible blue light on *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Online Journal of Dentistry & Oral Health**, v. 2, n. 3, p. 2–5, 18 nov. 2019.
- ALBA, M. N. *et al.* Clinical comparison of salicylic acid peel and LED-Laser phototherapy for the treatment of Acne vulgaris in teenagers. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 19, n. 1, p. 49–53, 2 jan. 2017.
- ALPERT, J. S. Jeremiah Metzger and the Era of Heliotherapy. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 126, p. 219–26, 2015.
- AMIN, R. M. *et al.* Antimicrobial blue light inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* by photo-excitation of endogenous porphyrins: *in vitro* and *in vivo* studies. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 48, n. 5, p. 562–568, 2016.
- ANGARANO, V. *et al.* The potential of violet, blue, green and red light for the inactivation of *P. fluorescens* as planktonic cells, individual cells on a surface and biofilms. **Food and Bioproducts Processing**, v. 124, p. 184–195, 2020a.
- ANGARANO, V. *et al.* Visible light as an antimicrobial strategy for inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Antibiotics**, v. 9, n. 4, p. 171, abr. 2020b.
- ASHKENAZI, H. *et al.* Eradication of *Propionibacterium acnes* by its endogenous porphyrins after illumination with high intensity blue light. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 17–24, 2003.
- BACHE, S. E. *et al.* Universal decontamination of hospital surfaces in an occupied inpatient room with a continuous 405 nm light source. **Journal of Hospital Infection**,

v. 98, n. 1, p. 67–73, 2018.

BAPTISTA, M. S. *et al.* Type I and II photosensitized oxidation reactions: guidelines and mechanistic pathways. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 93, n. 4, p. 912–919, 2017.

BLOCH, H. Solartheology, heliotherapy, phototherapy, and biologic effects: a historical overview. **Journal of the National Medical Association**, v. 82, n. 7, p. 517–8, 520–1, 1990.

BOUCHER, H. W. *et al.* Bad Bugs, No drugs: No ESKAPE! An update from the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 1, p. 1–12, 2009.

BUMAH, V. V. *et al.* The importance of porphyrins in blue light suppression of *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 212, n. July, p. 111996, 2020a.

BUMAH, V. V. *et al.* Optimizing the bactericidal effect of pulsed blue light on *Propionibacterium acnes* - A correlative fluorescence spectroscopy study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 202, n. 1, p. 111701, 4 jan. 2020b.

BUMAH, V. V. *et al.* The viability of human cells irradiated with 470-nm light at various radiant energies *in vitro*. **Lasers in Medical Science**, 24 jan. 2021.

COSTA, L. *et al.* Involvement of type i and type II mechanisms on the photoinactivation of non-enveloped DNA and RNA bacteriophages. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 120, p. 10–16, 2013.

DAI, T. *et al.* Blue light for infectious diseases : *Propionibacterium acnes* , *Helicobacter pylori* , and beyond ? **Drug Resistance Updates**, v. 15, n. 4, p. 223–236, 2012.

DAI, T. *et al.* Blue light eliminates community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in infected mouse skin abrasions. **Photomedicine and**

Laser Surgery, v. 31, n. 11, p. 531–538, 2013a.

DAI, T. *et al.* Blue light rescues mice from potentially fatal *Pseudomonas aeruginosa* burn infection: Efficacy, safety, and mechanism of action. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 1238–1245, 2013b.

DAI, T.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections - State of the art. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, n. 3–4, p. 170–188, set. 2009.

DANIELL, M. D.; HILL, J. S. A History of Photodynamic Therapy. **Australian and New Zealand Journal of Surgery**, v. 61, n. 5, p. 340–348, 1991.

DAVIES, J. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiología (Madrid, Spain)**, v. 12, n. 1, p. 9–16, 1996.

DONG, P. T. *et al.* Photolysis of staphyloxanthin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* potentiates killing by reactive oxygen species. **Advanced Science**, v. 6, n. 11, 2019.

DOS ANJOS, C. *et al.* Algicidal effect of blue light on pathogenic *Prototheca species*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 26, p. 210–213, 2019a.

DOS ANJOS, C. *et al.* Antimicrobial blue light inactivation of international clones of multidrug-resistant *Escherichia coli* ST10, ST131 and ST648. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 27, 2019b.

DOS ANJOS, C. *et al.* Inactivation of milk-borne pathogens by blue light exposure. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 2, p. 1261–1268, 2020a.

DOS ANJOS, C. *et al.* Antimicrobial blue light and photodynamic therapy inhibit clinically relevant β -lactamases with extended-spectrum (ESBL) and carbapenemase activity. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 32, n. October, 2020b.

DROPA, M. *et al.* Complex class 1 integrons harboring CTX-M-2-encoding genes in

clinical Enterobacteriaceae from a hospital in Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 8, p. 890–897, 2015.

EHRlich, P. Address in pathology, ON CHEMIOTHERAPY: Delivered before the seventeenth international congress of medicine. **BMJ**, v. 2, n. 2746, p. 353–359, 16 ago. 1913.

FEDOROVA, M.; BOLLINENI, R. C.; HOFFMANN, R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 33, n. 2, p. 79–97, mar. 2014.

FELIX GOMEZ, G. G. *et al.* Photoinhibition of *Streptococcus mutans* biofilm-induced lesions in human dentin by violet-blue light. **Dentistry Journal**, v. 7, n. 4, p. 113, 2019.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Medicina**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FERRER-ESPADA, R. *et al.* Antimicrobial blue light inactivation of microbial isolates in biofilms. **Lasers in Surgery and Medicine**, n. August, p. 1–7, 2019a.

FERRER-ESPADA, R. *et al.* Antimicrobial blue light inactivation of polymicrobial biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 721, 2019b.

FILA, G. *et al.* Antimicrobial blue light photoinactivation of *Pseudomonas aeruginosa*: Quorum sensing signaling molecules, biofilm formation and pathogenicity. **Journal of Biophotonics**, v. 11, n. 11, 2018.

FINSEN, Niels Ryberg. La photothérapie. G. Carre et C. Naud, 1899.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British journal of experimental pathology**, v. 10, n. 3, p. 226–236, 1929.

FRERCKS, J.; WEBER, H.; WIESENFELDT, G. Reception and discovery: the nature of Johann Wilhelm Ritter's invisible rays. **Studies in History and Philosophy of Science Part A**, v. 40, n. 2, p. 143–156, 2009.

GANZ, R. A. *et al.* *Helicobacter pylori* in patients can be killed by visible light. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 36, n. 4, p. 260–265, 2005.

GAWEŁ, S. *et al.* Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. **Wiadomości lekarskie (Warsaw, Poland : 1960)**, v. 57, n. 9–10, p. 453–5, 2004.

GELPI, A.; GILBERTSON, A.; TUCKER, J. D. Magic bullet: Paul Ehrlich, Salvarsan and the birth of venereology. **Sexually Transmitted Infections**, v. 91, n. 1, p. 68–69, 2015.

GHATE, V. *et al.* Irradiance and Temperature Influence the Bactericidal Effect of 460-Nanometer Light-Emitting Diodes on Salmonella in Orange Juice. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 4, p. 553–560, 2016.

GIESE, Arthur C. (Ed.). **Photophysiology: General Principles; Action of Light on Plants**. Elsevier, 2013.

GOLD, M. H. *et al.* A multicenter clinical evaluation of the treatment of mild to moderate inflammatory acne vulgaris of the face with visible blue light in comparison to topical 1% clindamycin antibiotic solution. **Journal of drugs in dermatology : JDD**, v. 4, n. 1, p. 64–70, 2005.

GRIGOR'EVA, A. *et al.* Changes in the ultrastructure of *Staphylococcus aureus* treated with cationic peptides and chlorhexidine. **Microorganisms**, v. 8, n. 12, p. 1–19, 2020.

GRZYBOWSKI, A.; SAK, J.; PAWLIKOWSKI, J. A brief report on the history of phototherapy. **Clinics in Dermatology**, v. 34, n. 5, p. 532–537, 2016.

HAMBLIN, M. R. *et al.* *Helicobacter pylori* accumulates photoactive porphyrins and is

killed by visible light. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2822–2827, jul. 2005.

HAMBLIN, Michael R.; HUANG, Yingying (Ed.). **Handbook of photomedicine**. Taylor & Francis, 2013.

HELANDER, I. M.; MATTILA-SANDHOLM, T. Fluorometric assessment of Gram-negative bacterial permeabilization. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 213–219, 2000.

HOCKBERGER, P. E. The discovery of the damaging effect of sunlight on bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 58, n. 2–3, p. 185–191, 2000.

HOLLOWAY, M. Soaking up the rays. *Scientific American*, v. 276, n. 2, p. 24-25, 1997.

HÖNIGSMANN, H. History of phototherapy in dermatology. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 12, n. 1, p. 16–21, 2013.

HUANG, L. *et al.* Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an *in vitro* study on Gram-negative and Gram-positive bacteria. v. 44, n. 6, p. 490–499, 2013.

HUI, J. *et al.* Photo-disassembly of membrane microdomains revives conventional antibiotics against MRSA. **Advanced Science**, v. 1903117, 2020.

HUTTNER, A. *et al.* Antimicrobial resistance: A global view from the 2013 World Healthcare-Associated Infections Forum. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 2, n. 1, 2013.

HYUN, J. E.; CHOI, C.; LEE, S. Y. Synergistic effects of blue light-emitting diodes in combination with antimicrobials against *Escherichia coli* O157:H7 and their mode of action. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 213, p. 112079, 2020.

HYUN, J. E.; LEE, S. Y. Antibacterial effect and mechanisms of action of 460–470 nm light-emitting diode against *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* on the surface of packaged sliced cheese. **Food Microbiology**, v. 86, n. March 2019, p. 103314, 2020.

HYUN, J. E.; MOON, S. K.; LEE, S. Y. Antibacterial activity and mechanism of 460–470 nm light-emitting diodes against pathogenic bacteria and spoilage bacteria at different temperatures. **Food Control**, v. 123, n. July 2020, p. 107721, 2021.

INGRAM, L. O. Mechanism of lysis of *Escherichia coli* by ethanol and other chaotropic agents. **Journal of Bacteriology**, v. 146, n. 1, p. 331–336, 1981.

JEAN, D.; BRIOLAT, V.; REYSSET, G. Oxidative stress response in *Clostridium perfringens*. **Microbiology**, v. 150, n. 6, p. 1649–1659, 2004.

JETT, B. D. *et al.* Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. **BioTechniques**, v. 23, n. 4, p. 648–650, 1997.

KOHANSKI, M. A. *et al.* A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 797–810, 2007.

KRESS, G. H.; FRANCISCO, S. Sir Alexander Fleming-Discoverer of Penicillin. **California and western medicine**, v. 63, n. 3, p. 153, 1945.

LEANSE, L. G. *et al.* Evaluating the potential for resistance development to antimicrobial blue light (at 405 nm) in Gram-negative bacteria: *in vitro* and *in vivo* studies. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2403, 2018.

LEANSE, L. G. *et al.* Quinine enhances photo-inactivation of Gram-negative bacteria. **Journal of Infectious Diseases**, v. 221, n. 4, p. 618–626, 2020a.

LEANSE, L. G. *et al.* Dual-wavelength photo-killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **JCI Insight**, v. 5, n. 11, 4 jun. 2020b.

LEANSE, L. G. *et al.* Effective treatment of cutaneous mold infections by antimicrobial blue light that is potentiated by quinine. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 2, p. 1–8, 2021.

LEANSE, L. G.; GOH, X. S.; DAI, T. Quinine improves the fungicidal effects of antimicrobial blue light: implications for the treatment of cutaneous candidiasis. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 52, n. 6, p. 569–575, 2020.

LEANSE, L. G.; ZENG, X.; DAI, T. Potentiated antimicrobial blue light killing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by pyocyanin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 215, p. 112109, 2021.

LEMBO, A. J. *et al.* Treatment of *Helicobacter pylori* infection with intra-gastric violet light phototherapy: A pilot clinical trial. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, n. 5, p. 337–344, 2009.

LI, M. Y. *et al.* Quenching of singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$) by azide anion in solvent mixtures. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 6, p. 760, 2001.

LIGON, B. L. Penicillin: Its discovery and early development. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 52–57, 2004.

LIU, X. *et al.* Photoinactivation of *Moraxella catarrhalis* using 405-nm blue light: implications for the treatment of otitis media. **Photochemistry and Photobiology**, v. 96, n. 3, p. 611–617, 2020.

LIVERMORE, D. M. Discovery research: The scientific challenge of finding new antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 9, p. 1941–1944, 2011.

LOH, B.; GRANT, C.; HANCOCK, R. E. W. Use of the fluorescent probe 1-N-phenyl-naphthylamine to study the interactions of aminoglycoside antibiotics with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 26, n. 4, p. 546–551, 1984.

MACLEAN, M. *et al.* Environmental decontamination of a hospital isolation room using high-intensity narrow-spectrum light. **Journal of Hospital Infection**, v. 76, n. 3, p. 247–251, 2010.

MACLEAN, M. *et al.* 405 nm light technology for the inactivation of pathogens and its potential role for environmental disinfection and infection control. **Journal of Hospital Infection**, v. 88, n. 1, p. 1–11, 2014.

MARTENS, E.; DEMAIN, A. L. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. **Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 5, p. 520–526, 2017.

MCDONAGH, A. F. Phototherapy: From ancient egypt to the new millennium. **Journal of Perinatology**, v. 21, p. S7–S12, 2001.

MCDUGAL, L. K. *et al.* Pulsed-Field Gel Electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: Establishing a National Database. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5113–5120, 2003.

MEURER, L.; PAYNE, W.; GUFFEY, J. S. Visible light as an inhibitor of *Campylobacter jejuni*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n. 1, p. 105818, 2020.

MOHAMAD, S. A. *et al.* Potential for direct application of blue light for photo-disinfection of dentine. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 215, p. 112123, 2021.

MOLLER, K. I. *et al.* How Finsen's light cured lupus vulgaris. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, v. 21, n. 3, p. 118–124, 2005.

PALGAN, I. *et al.* Effectiveness of High Intensity Light Pulses (HILP) treatments for the control of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice, orange juice and milk. **Food Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 14–20, 2011.

PARSONS, J. B.; ROCK, C. O. Bacterial lipids: Metabolism and membrane

homeostasis. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n. 3, p. 249–276, 2013.

PATTISON, D. I.; RAHMANTO, A. S.; DAVIES, M. J. Photo-oxidation of proteins. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 11, n. 1, p. 38–53, 2012.

PAVIE, M. C. *et al.* Blue light-emitting diode in healthy vaginal mucosa - a new therapeutic possibility. **Lasers in Medical Science**, v. 34, n. 5, p. 921–927, 2019.

PENDLETON, J. N.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 11, n. 3, p. 297–308, 2013.

PLAVSKII, V. Y. *et al.* Porphyrins and flavins as endogenous acceptors of optical radiation of blue spectral region determining photoinactivation of microbial cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 183, p. 172–183, 2018.

POETSCH, A. R. The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 207–219, 2020.

RAJU, T. N. The Nobel Chronicles. **The Lancet**, v. 353, n. 9156, p. 936, 1999.

ROBERT R. REDFIELD. Antibiotic resistance threats in the United States. **Centers for Disease Control and Prevention**, p. 1–113, 2019.

ROELANDTS, R. The history of phototherapy: Something new under the sun? **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 46, n. 6, p. 926–930, 2002.

ROLLIER, A. **Heliotherapy**. London: H. Frowde. 1923.

ROSENBERG, M.; AZEVEDO, N. F.; IVASK, A. Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

RUPEL, K. *et al.* Blue laser light inhibits biofilm formation *in vitro* and *in vivo* by inducing oxidative stress. **NPJ Biofilms and Microbiomes**, v. 5, n. 1, p. 1–11, 2019.

RUSSELL, E. H. *et al.* Ultra-violet radiation and actinotherapy. **Ultra-violet radiation and actinotherapy**, 2nd Edition, 1927.

SABINO, C. P. *et al.* Inactivation kinetics and lethal dose analysis of antimicrobial blue light and photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 28, p. 186–191, 2019.

SABINO, C. P. **Inativação fotodinâmica antimicrobiana mediada por azul de metileno: análise de cinética de inativação e mecanismos bioquímicos**. 2021. Universidade de São Paulo, 2021.

SCHMID, J. *et al.* Antimicrobial effect of visible light—photoinactivation of *Legionella rubrilucens* by irradiation at 450, 470, and 620 nm. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, 2019.

SCHWARTZ, R. S. Paul Ehrlich's Magic Bullets. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 11, p. 1079–1080, 11 mar. 2004.

SRIMAGAL, A.; RAMESH, T.; SAHU, J. K. Effect of light emitting diode treatment on inactivation of *Escherichia coli* in milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 378–385, 2016.

TACCONELLI, E. *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318–327, 2018.

TOMB, R. M. *et al.* Assessment of the potential for resistance to antimicrobial violet-blue light in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 100, 29 dez. 2017.

TRÄUBLE, H.; OVERATH, P. The structure of *Escherichia coli* membranes studied

by fluorescence measurements of lipid phase transitions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 307, n. 3, p. 491–512, maio 1973.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES. National Action Plan for Combating Antibiotic-Resistant Bacteria (CARB), 2020-2025. n. October, p. 2020–2025, 2020. Disponível em: <<https://www.hhs.gov/sites/default/files/carb-national-action-plan-2020-2025.pdf>>.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Battle of the Bugs: Fighting Antibiotic Resistance**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/drugs/information-consumers-and-patients-drugs/battle-bugs-fighting-antibiotic-resistance>>.

VAN MUNSTER, E. B.; GADELLA, T. W. J. Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM). **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 95, p. 143–175, 2005.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P & T: a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 40, n. 4, p. 277–83, abr. 2015.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 13–28, 1998.

WANG, H.; JOSEPH, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free radical biology and medicine**, v. 27, n. 5-6, p. 612-616, 1999.

WANG, Y. *et al.* Antimicrobial blue light inactivation of Gram-negative pathogens in biofilms: *in vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 9, p. 1380–1387, 2016.

WANG, Y. *et al.* Antimicrobial blue light inactivation of pathogenic microbes: state of the art. **Drug Resistance Updates**, v. 33–35, p. 1–22, 2017a.

WANG, Y. *et al.* Antimicrobial blue light: an alternative therapeutic for multidrug-

resistant gonococcal infections? **MOJ Solar and Photoenergy Systems**, v. 1, n. 2, p. 38–39, 2017b.

WANG, Y. *et al.* Antimicrobial blue light inactivation of *Neisseria gonorrhoeae*: roles of wavelength, endogenous photosensitizer, oxygen, and reactive oxygen species. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 51, n. 9, p. 815–823, 2019a.

WANG, Y. *et al.* Photoinactivation of *Neisseria gonorrhoeae*: a paradigm-changing approach for combating antibiotic-resistant gonococcal infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 220, n. 5, p. 873–881, 31 jul. 2019b.

WHEELAND, R. G.; DHAWAN, S. Evaluation of self-treatment of mild-to-moderate facial acne with a blue light treatment system. **Journal of drugs in dermatology : JDD**, v. 10, n. 6, p. 596–602, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2014). **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. World Health Organization. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2019). **New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis**. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>

WOZNIAK, A. *et al.* Antimicrobials are a photodynamic inactivation adjuvant for the eradication of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–13, 2019.

WU, J. *et al.* Changes of intracellular porphyrin, reactive oxygen species, and fatty acids profiles during inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antimicrobial blue light. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. November, p. 1–10, 2018.

WYSS, P. History of Photomedicine. **Photomedicine in Gynecology and Reproduction**, p. 4–11, 2000.

YIN, R. *et al.* Light based anti-infectives: Ultraviolet C irradiation, photodynamic therapy, blue light, and beyond. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 5, p. 731–762, 2013.

ZHANG, L. *et al.* Antimicrobial activity of an implantable wireless blue light-emitting diode against root canal biofilm *in Vitro*. **Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery**, v. 38, n. 11, p. 694–702, 2020.

ZHANG, Y. *et al.* Antimicrobial blue light therapy for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in a mouse burn model: Implications for prophylaxis and treatment of combat-related wound infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 12, p. 1963–1971, 2014a.

ZHANG, Y. *et al.* Antimicrobial blue light therapy for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in a mouse burn model: implications for prophylaxis and treatment of combat-related wound infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 12, p. 1963–1971, 2014b.

ZHAO, Y.; ZHANG, Y.; DONG, J. Evaluating the efficacy of anti-fungal blue light therapies via analyzing tissue section images. **Lasers in Medical Science**, p. 1-11, 2021.

ZHU, X. *et al.* Design of imperfectly amphipathic α -helical antimicrobial peptides with enhanced cell selectivity. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 1, p. 244–257, 2014.