

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

FABIO FRANCISCO PINTO JUNIOR

Interação e internalização de curcumina em culturas bacterianas

São Carlos
2019

FABIO FRANCISCO PINTO JUNIOR

Interação e internalização de curcumina em culturas bacterianas

Dissertação apresentada ao programa de Pós – Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães

Versão Corrigida
(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Pinto Junior, Fabio Francisco

Interação e internalização de curcumina em culturas bacterianas / Fabio Francisco Pinto Junior; orientador Francisco Eduardo Gontijo Guimarães - versão corrigida -- São Carlos, 2019.

207 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2019.

1. Curcumina. 2. Escherichia coli. 3. Staphylococcus aureus. 4. Streptococcus mutans. 5. Inativação Fotodinâmica. I. Guimarães, Francisco Eduardo Gontijo, orient. II. Título.

*Ao meu pai Fabio Francisco Pinto
(in memoriam)*

*À minha esposa Carolina,
Ao meu filho Heitor,
À minha mãe Eunice,
Aos meus irmãos Donovan e Gustavo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao professor Vanderlei S. Bagnato por ter me encorajado e acolhido no Grupo de Óptica. Por todas as informais orientações, pelo apoio direto e indireto, por sempre me ouvir prontamente e por seu incomparável exemplo de trabalho e dedicação à pesquisa.

Agradeço ao meu orientador Francisco E. G. Guimarães por ter me aceitado como seu orientando mesmo sem me conhecer. Pessoa ímpar! Determinado e atencioso, me ensinou pacientemente, e em várias ocasiões por longas horas, assuntos que jamais pensei que entenderia. Do seu meticuloso cuidado com os números ao seu magnífico olhar de fino trato aos dados e gráficos analisados pode me ensinar como, em suas palavras, “Vestir a camisa da Física!”. A intensa e inigualável relação que tivemos ao longo destes dois anos, acredito que, ficará marcada em nossas vidas como um valoroso aprendizado e o início de uma amizade.

Agradeço aos colaboradores, à toda equipe técnica e administrativa do grupo de Óptica. Em especial, à professora Alessandra N. S. Rastelli pelos ensinamentos práticos em Microbiologia e, principalmente, pelo paciente ensinamento de um bom planejamento e execução de um Projeto Piloto, a mim, tão necessário antes de um grande experimento. Ao Sebastião Pratavieira e à Lilian T. Moriyama pelo incentivo, presteza, aconselhamentos e parceria. À brilhantíssima Natália M. Inada pelos preciosos, sábios, seguros e acertados conselhos em momentos decisivos da minha jornada.

Agradeço a todos os colegas e alunos do grupo de Óptica e de outros grupos, mestrados e doutorandos, como também aos Pós-doutores os quais me incentivaram, apoiaram, discutiram nos bastidores meus resultados e me ajudaram em diversos momentos durante este mestrado. Em especial à Kate C. Blanco, Ana P. da Silva, ao Vitor H. Panhoca, ao José D. Vollet Filho, Mariana C. Geralde, Francine P. Venturini, Hilde H. Buzzá, Larissa M. Souza, Ilaiáli S. Leite, Thaila Q. Corrêa, Bruno P. de Oliveira, Woner Mion, Gustavo T. Valente, Otávio B Silva, Marcelo S. Nogueira, Bruno A. Ono e Maria Luiza Ferreira Vicente pelas diversas e imprescindíveis colaborações de caráter prático e/ou teórico neste trabalho e na vida acadêmica.

À colega Amanda C. Zangirolami e ao colega Raphael A. Caface o meu mais sincero obrigado pela atenção, por todo apoio, colaboração, ensinamentos, paciência e ao tempo dedicado em diversos momentos durante todos os meses de trabalho.

Agradeço aos principais e fundamentais amigos dos grupos virtuais os quais participei desde o início, e ainda participo, "*Darkside_Coffe*". Em especial aos membros ecléticos, de físicos a biólogos, passando por educadores e engenheiros como o Renan A. Romano, Ramon G. T. Rosa, Mohammad Sadraeian, Woner Mion e Gustavo T. Valente pela criatividade empenhada nos grupos, espírito solidário e o divertidíssimo companheirismo.

Agradeço aos meus pais, meus irmãos, minha cunhada Lica, minha amiga Luíze, meus amigos Andrey, Bruno, Murilo, Fabião e Bretas pelo amor que sempre me deram, por toda a motivação, apoio e sustentação, que se não houvesse jamais teria findado este trabalho.

Agradeço a CAPES pelo suporte financeiro durante o mestrado.

Agradeço a Universidade de São Paulo e ao Instituto de Física de São Carlos pelo acolhimento em sua robusta infraestrutura material e humana.

Por fim, diante da temerosa situação em que a Ciência e a Educação se encontram neste país tão rico, e atualmente tão mal gerido a ponto de chacota. Gostaria de agradecer e também dedicar este trabalho a todos aqueles brasileiros e brasileiras que cada vez mais estão tendo seus direitos extirpados, que pagam seus impostos de forma digna e sofrida, sem fazer a mínima ideia de que ajudam a contribuir com o financiamento de grandes pesquisas, e que, por obrigação moral, me motivam no firme propósito de fazer Ciência.

“A matriz da esperança é a mesma da educabilidade do ser humano: o inacabamento de seu ser de que se tornou consciente.”

Paulo Freire

RESUMO

PINTO JUNIOR, F.F. **Interação e internalização de curcumina em culturas bacterianas**. 2019. 209p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

O presente estudo buscou o entendimento das propriedades de diferentes curcuminas, em solução aquosa desde o processo de interação e internalização dessas moléculas em culturas bacterianas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, nas formas planctônica e de biofilmes. Curcuminas de diferentes procedências foram utilizadas (Natural, Sigma e Sintética). Medidas de absorvância mostraram que a curcumina Natural apresentou excelente estabilidade temporal quanto à formação de agregados e particulados em solução aquosa. As outras curcuminas apresentaram três fases sucessivas que consumiram curcumina livre através da formação de agregados moleculares (<70 nm) e particulados grandes (~1µm.) Microscopia confocal demonstrou a viabilidade da internalização de curcumina sintética nas células em biofilmes e na forma planctônica. Medidas da recuperação após fotodegradação (FRAP) mostraram que o tempo de difusão da curcumina pela parede celular é da ordem de 12 segundos. Assim, identificou-se que a incorporação nas células dos biofilmes é quatro vezes maior que na forma planctônica e que a forma agregada da curcumina é importante por sua estabilidade à fotodegradação em relação à forma livre. Já a curcumina internalizada se encontra na forma livre de modo que as moléculas fotodegradadas são totalmente trocadas para tempos próximos de 10 segundos. Diferentes técnicas ópticas envolvendo medidas de absorvância foram aprimoradas para caracterizar a preparação e contagem de células na forma planctônica. Estes procedimentos levaram a um melhor entendimento dos processos de interação e internalização das diferentes formas de curcumina nas bactérias. As interações e internalizações das curcuminas se deram de forma diferente para a *E. coli* do que para a *S. aureus* e a *S. mutans*. Todas as amostras de curcumina apresentaram-se eficientes nas interações bacterianas, sendo as sintéticas com maior interação.

Palavras chaves: Curcumina. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. *Streptococcus mutans*. Inativação Fotodinâmica.

ABSTRACT

PINTO JUNIOR, F.F. **Interaction and internalization of curcumin in bacterial cultures**. 2019, 209p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

The present study sought to understand the properties of different curcumin in aqueous solution from the process of interaction and internalization of these molecules in bacterial cultures of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*, in planktonic and biofilm forms. Curcumin of different compositions was used (Natural, Sigma and Synthetic). Absorbance measurements showed that Natural curcumin showed excellent temporal stability regarding the formation of aggregates and particulates in aqueous solution. The other curcumin exhibits three successive phases that consume free curcumin through formation of molecular aggregates (<70 nm) and large particulates (~ 1 μ m.) Confocal microscopy demonstrated the viability of internalizing synthetic curcumin in biofilm and planktonic cells. . Measures of recovery after photodegradation (FRAP) showed that curcumin diffusion time through the cell wall is of the order of 12 seconds. Thus, it was found that the incorporation into the biofilm cells is four times greater than the planktonic form and that the aggregate form of curcumin is important because of its photodegradation stability in relation to the free form. Internalized curcumin is in the free form so that the photodegraded molecules are completely changed for times around 10 seconds. Different optical techniques involving absorbance measurements have been improved to characterize the preparation and counting of planktonic cells. These procedures led to a better understanding of the interaction and internalization processes of the different forms of curcumin in bacteria. Curcumin interactions and internalizations were different for *E. coli* than for *S. aureus* and *S. mutans*. All curcumin were efficient in bacterial interactions, and synthetic ones with greater interaction.

Keywords: Curcumin. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. *Streptococcus mutans*. Photodynamic Inactivation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Paredes celulares de bactérias: (a, b) Os diagramas esquemáticos mostram as paredes celulares das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente. A foto central apresenta células de *Staphylococcus aureus* (roxa, gram-positiva) e de *Escherichia coli* (rosa, gram-negativa).47
- Figura 2 - *Escherichia coli*.....51
- Figura 3 - *Staphylococcus aureus* – Micrografia eletrônica.....52
- Figura 4 - Micrografia eletrônica do *Streptococcus mutans*³⁵.....55
- Figura 5 - Estrutura química dos elementos curcuminóides56
- Figura 6 - As interações proteína-curcumina que são facilitadas pelos oxígenos que aceitam ligações de hidrogênio da curcumina dicetônica (em cima) e curcumina enólica (em baixo)57
- Figura 7 - Cary UV-Vis 50 – Varian.....60
- Figura 8 - Imagens de microscopia confocal de *S. mutans* a) coradas com curcumina e com o marcador live&dead para b) menor e c) maior ampliação81
- Figura 9 - a) Imagem de um corte confocal de biofilme após incubação por 1 hora em solução aquosa (PBS) de curcumina SIGMA na concentração de 167 μ M. b) Comparação entre espectros de emissão da curcumina medidos em três regiões de interesse (ROI) distintas: no biofilme (ROI 1), no particulado (ROI 2) e na solução (ROI 3). c) Decaimentos da fluorescência da curcumina internalizada em células de um biofilme de *S. mutans* e na forma agregada em particulado.....83
- Figura 10 - a) Imagem no modo canal de um plano focal próximo à lâmina de vidro de *S. mutans* na forma de biofilme e planctônica para curcumina em PBS na concentração de 169 μ M. b) Esquema da configuração óptica para a imagem. c) A mesma imagem, para a qual os pixels com intensidade maior que 50 foram marcados de vermelho conforme d) histograma que fornece o número de pixels para cada intensidade medida.....87
- Figura 11 - a) Regiões de interesse no experimento de FRAP na imagem no modo canal para as condições de solução de curcumina em PBS a 169 μ M. b) Gráfico log da intensidade de emissão da curcumina avaliada nessas regiões em função do tempo de aquisição das imagens. c) Comparação da recuperação da fluorescência para várias concentrações (pontos abertos) e as linhas contínuas são ajustes por funções que descrevem o processo através de um tempo característico $t_{1/2}$91
- Figura 12 - Imagem de microscopia confocal no modo canal que contém a região (quadrado branco) que foi irradiada no experimento anterior e a área maior que não sofreu o efeito da dose aplicada de 100 J/cm². A cor verde indica a presença do marcador laranja de acridina e que

viabilidade das células. Já a cor vermelha é uma indicação da internalização do brometo de etídio através da parede que sofreu necrose ou danos permanentes, que indicam a inviabilidade da célula.

..... 96

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - a) Espectro de Absorbância na região espectral UV-Vis para a curcumina Sigma em etanol na concentração de 27 μ M. b) Absorbância da curcumina Sigma medida em 449 nm para a faixa de concentrações molares típicas utilizadas em IF. A concentração molar foi estendida para a região de 1 nM a 100 μ M para evidenciar os limites superior e inferior do espectrômetro utilizado no presente trabalho. A linha vermelha corresponde ao ajuste da Lei de Beer-Lambert e a linha preta corresponde ao valor do coeficiente de extinção medido na referência. O ajuste da banda π - π^* leva a contribuição de duas bandas: uma em azul e outra em laranja com máximos em 365 nm e 434 nm, respectivamente.68
- Gráfico 2 - a) Espectro de Absorbância na região espectral UV-Vis para a curcumina Sigma em etanol nas concentrações de 14 μ M, 27 μ M, 163 μ M e de 270 μ M. Neste gráfico fica visível que conforme há o aumento da concentração também ocorre o aumento das linhas de absorção e também uma mudança na forma da linha, entre 600 e 800 nm, gerada devido ao espalhamento associado provavelmente à formação de partículas moleculares aglomeradas. b) Curvas normalizadas da absorbância da curcumina Sigma medida na região espectral UV-Vis na concentração molar de 64 μ M. A curva superior mostra pelo espalhamento observado na região entre 600 e 800 nm a formação de partículas aglomeradas, hipótese esta confirmada e observada na curva inferior gerada após a centrifugação, a 15.000 rpm por 15 min, pelo desaparecimento do espalhamento na região entre 600 e 800 nm.....70
- Gráfico 3 - a) Espectro de Absorbância na região espectral UV-Vis para a curcumina Natural em etanol na concentração de 27 μ M ao longo de 2 h e 50 min, deixando evidente que o padrão da curva não se altera e de que não há a formação de aglomerados de partículas moleculares. b) Espectro de Absorbância na região espectral UV-Vis para a curcumina Sigma em etanol na concentração de 27 μ M ao longo de 2h e 50 min deixando evidente a formação de aglomerados de partículas moleculares que é observado na significativa modificação das curvas de absorbância em que saem de partículas livres inicialmente e vão para partículas aglomeradas após as 2 h e 50 min.74
- Gráfico 4 - Curva temporal de nucleação da curcumina Sigma em PPS, com a evolução do tempo observa-se uma transição do espalhamento Rayleigh para o espalhamento Mie.75

- Gráfico 5 - Dinâmica temporal da densidade óptica nos comprimentos de onda de 355 nm, 420 nm, 500 nm e de 700 nm para avaliação dos três tipos de curcuminas. Observa-se primeiramente a estabilidade da curcumina Natural em relação às outras duas que apresentam comportamento semelhantes ao longo do tempo. Sugere-se que a primeira subida da curva de espalhamento esteja associada à conversão de agregados moleculares para particulados, enquanto a segunda subida esteja associada à conversão de ambas formas livres diretamente para o aumento de tamanho dos agregados particulados 79
- Gráfico 6 - a) Variação da intensidade de emissão da curcumina em função do tempo de incubação dentro do intervalo de 20 min para regiões de interesse dentro do biofilme (círculos abertos), na forma planctônica (quadrados abertos) e em solução (triângulos abertos) para a concentração de curcumina de 167 μM . b) Dependência da mesma emissão em solução em escala ampliada. c) Dependência da intensidade de emissão da curcumina em biofilme para várias concentrações. d) Esquema da configuração óptica usada para a tomada da imagem..... 85
- Gráfico 7 - Comparação entre espectros de emissão da curcumina em diferentes meios para diferentes concentrações. O espectro de curcumina em emulsão em baixa concentração é usado como referência, 88
- Gráfico 8 - a) Primeira parte: intensidade da emissão da curcumina dentro da região de interesse (círculo em vermelho da imagem inserida) em função da dose acumulada. A linha pontilhada é a superposição de dois efeitos descritos por I_1 e I_2 para a mesma dose característica de 9 J/cm^2 . b) Segunda parte: evolução temporal da intensidade emissão da curcumina (pontos abertos verdes) no interior mesma região da primeira parte (quadrado verde) medida logo após a aplicação da dose de aproximadamente 100 J/cm^2 da primeira parte. A figura mostra três imagens em três tempos distintos da serie temporal....93
- Gráfico 9 - Monologarítmo de 12 medidas do espectro de absorvância na região espectral UV-Vis de alíquotas de 2 ml de sobrenadante bacteriano de *E. coli* lavada em solução salina de PBS, com UFC médio de $1,2 \times 10^9$ bactérias por mililitro de suspensão, em que cada medida foi obtida após a centrifugação por 10 minutos com velocidades que variaram de 800 rpm (100 x g) com incrementos de 200 rpm até 3000 rpm (1409 x g). É possível identificar que a bactéria *E. coli* em solução salina apresenta uma curva com espalhamentos característicos de partículas pequenas com os índices de λ variando de -1,7 até -1,5..... 99

- Gráfico 10 -Monologarítmo de 12 medidas do espectro de absorvância na região espectral UV-Vis de alíquotas de 2 ml de sobrenadante bacteriano de *S. aureus* lavada em solução salina de *PBS*, com UFC médio de $1,3 \times 10^9$ bactérias por mililitro de suspensão, em que cada medida foi obtida após a centrifugação por 10 minutos com velocidades que variaram de 800 rpm (100 x g) com um incremento de 200 rpm até 3000 rpm (1409 x g). É possível identificar que a bactéria *S. aureus* em solução salina apresenta uma curva com espalhamentos característicos de partículas pequenas com os índices do λ variando de -1,7 até -1,28. 101
- Gráfico 11 -Todos os pontos foram obtidos no espectro de absorvância na região espectral UV-Vis em 600 nm e os retirados do Gráfico 9, em azul sobrenadante da bactéria *E. coli*, e do Gráfico 10, em vermelho sobrenadante da bactéria *S. aureus*. Ao compará-los observa-se um comportamento similar para ambos organismos, de modo que a absorvância em 600 nm dos centrifugados deles seguem claramente dois regimes. Um que vai de decaindo praticamente linearmente de 800 rpm (100 x g) até 2400 rpm (902 x g). Outro de regime constante que vai de 2400 rpm (902 x g) até 3000 rpm (1409 x g). Evidencia-se no primeiro regime que conforme o centrifugado sofre o aumento da rotação da centrífuga a absorvância em 600 nm diminui, devido à diminuição de partículas no meio que são arrastadas para o fundo do tubo para a formação do *pellet*. Mas isso só ocorre até o limite de 2400 rpm (902 x g). A partir daí pode-se afirmar que a absorvância em 600 nm se mantém constante e próximo a 0,1. Note também que a centrifugação com a rotação em torno de 3000 rpm (1409 x g), nas condições deste experimento, sempre deixarão partículas no centrifugado que não serão arrastadas para o fundo do tubo e conseqüentemente não farão parte do *pellet*..... 102
- Gráfico 12 Monologarítmo com a média de 12 medidas do espectro de Absorvância na região espectral UV-Vis de alíquotas de 2 ml de caldo bacteriano de *E. coli* em solução de *BHI*, com UFC inicial médio de $7,5 \times 10^6$ bactérias por mililitro de suspensão, em que cada medida foi obtida após o crescimento em estufa a 37,5 °C com agitação de 120 rpm. É possível identificar que a bactéria *E. coli* em solução de *BHI* apresenta a mesma uma curva apresentada no Gráfico 9, em solução salina, com espalhamentos característicos de partículas pequenas com os índices do λ variando de -1,7 até -1,35. 105
- Gráfico 13 -Os pontos deste gráfico foram obtidos do espectro de absorvância na região espectral UV-Vis do Gráfico 12 traçando-se uma perpendicular no comprimento de onda de 600 nm e coletando-se para cada curva de absorvância o respectivo valor em cada tempo medido. No ajuste realizado para esta curva evidenciou o crescimento exponencial da bactéria *E. coli* e sua respectiva fase logarítmica de crescimento, confirmando assim por meio desta medida óptica a viabilidade da cepa utilizada e o método de crescimento adotado. 106

- Gráfico 14- Monologarítmo com a média de 11 medidas do espectro de absorvância na região espectral UV-Vis de alíquotas de 2 ml de caldo bacteriano de *S. aureus* em solução de *BHI*, com UFC inicial médio de $7,5 \times 10^6$ bactérias por mililitro de suspensão, em que cada medida foi obtida após o crescimento em estufa a $37,5 \text{ }^\circ\text{C}$ com agitação de 120 rpm. É possível identificar que a bactéria *S. aureus* em solução de *BHI* apresenta curvas semelhantes àquelas identificadas no Gráfico 10, em solução salina, com espalhamentos característicos de partículas pequenas com os índices do λ de -1,7. 108
- Gráfico 15 Os pontos deste gráfico foram obtidos do espectro de absorvância na região espectral UV-Vis do Gráfico 14 traçando-se uma perpendicular no comprimento de onda de 600 nm e coletando-se para cada curva de absorvância o respectivo valor em cada tempo medido. No ajuste realizado para esta curva evidenciou-se o crescimento exponencial da bactéria *S. aureus* em sua respectiva fase logarítmica de crescimento, confirmando assim por meio destas medidas ópticas a viabilidade da cepa utilizada e o método de crescimento adotado. 109
- Gráfico 16 Monologarítmo do espectro de Absorbância na região espectral UV-Vis com a média de 27 medidas de absorvância de alíquotas de 2 ml de caldo bacteriano de *S. mutans* em solução de *BHI* com 1% de glicose, com UFC inicial médio de $1,0 \times 10^6$ bactérias por mililitro de suspensão, em que cada medida foi obtida após o crescimento em estufa a $37,5 \text{ }^\circ\text{C}$ com agitação de 120 rpm. É possível identificar que conforme a bactéria *S. mutans* vai crescendo ao longo do tempo as curvas vão aumentando a absorvância medida em relação à curva anterior e que as últimas sete medições próximas às 18 horas mostram-se bem próximas devido ao aumento do espalhamento ocasionado pela intensidade do turvor do caldo bacteriano associado ao crescimento do microrganismo; O espalhamentos característicos de partículas pequenas é apresentado com os índices de espalhamento de λ variando de -4 e -1,5; Com isso tem-se que a equação característica apresentada para esse experimento tem no início a equação $y=1700 \cdot x^{-1,7} + 1,5E^7 \cdot x^{-4}$, com λ de -1,7, passa para o regime com λ de -1,6, com equação de $y=1900 \cdot x^{-1,6} + 1,5E^7 \cdot x^{-4}$ e estabiliza com λ de -1,5 e tendo uma equação de $y=6200 \cdot x^{-1,5} + 1,5E^9 \cdot x^{-4}$ 111
- Gráfico 17 Curva de crescimento da bactéria *S. mutans* construído a partir da união dos dados dos Espectro de Absorbância na região espectral UV-Vis medidos no Gráfico 16 e que foram retiradas no comprimento de onda de 600 nm e dos resultados obtidos das contagens das UFC / ml. Satisfatoriamente é possível observar que o crescimento bacteriano apresentado tanto pelas medidas de absorvância quanto pelas UFC / ml seguem o mesmo regime de crescimento até as 11 horas medidas. Este resultado também confirma a viabilidade da bactéria *S. mutans* para o estudo e as condições adequadas de crescimento promovidas durante o experimento. 112

- Gráfico 18 -Semilogarítmo obtido dos espectro de absorbância na região espectral UV-Vis do Gráfico 17. Para efeito de cálculos tomamos que a fase exponencial de crescimento da bactéria *S. mutans* está nos pontos da contagem de tempo entre 5,5 e 9 horas; Com isso, obtém-se todos os parâmetros possíveis de crescimento da bactéria *S. mutans* utilizada, como o número de gerações (n) de 1,02, o tempo de geração (g) de 0,98 h aproximadamente 1 h, a taxa de divisão (v) de 1,02 h⁻¹ e a taxa específica de crescimento (k) de 0,301 h⁻¹. 113
- Gráfico 19 Monologarítmo dos espectros de absorbância na região espectral UV-Vis das médias das medidas de absorbância do sobrenadante da *E. coli* submetido às diluições do tipo S. As curvas referentes às diluições seguem a equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$ apresentada para espalhamentos característicos de partículas pequenas com índices de λ de -1,7 e de -4, como descrito na subseção 1.4.1. Notam-se que os comportamentos das curvas começam a homogeneizar-se em 600 nm, a partir da curva S₃ próximo à absorbância de 1, apresentando características semelhantes para menores comprimentos de onda. Observa-se que conforme a diluição do sobrenadante do caldo lavado aumenta a curva de absorbância diminui, uma característica já esperada, ao passo que quanto maior a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes na solução. 116
- Gráfico 20-Logarítmico obtido dos respectivos espectros de absorbância na região espectral UV-Vis do Gráfico 19 retiradas no comprimento de onda de 600 nm para cada curva média de absorbância medida de cada diluição S e correlacionada às médias do *UFC médio / ml*. É possível estabelecer uma relação direta entre a média da quadrupla das absorbâncias de cada amostra S e seu *UFC médio / ml*. A linearidade apresentada entre as diluições S₂ e S₇ pelas medidas das médias das absorbâncias também é observada pelas contagens das unidades formadoras de colônias. 117
- Gráfico 21- Logaritmo que estabelece a relação direta entre as medidas médias das quadruplas de absorbância e o *UFC médio / ml* trabalhado com a bactéria *Escherichia coli*. Para construir este gráfico os dados foram retirados dos Gráfico 19 e Gráfico 20. Observa-se uma relação linear entre as médias das medidas de absorbância (Abs) em 600 nm e *UFC / ml*, estabelecendo assim uma forma indireta de contagem de células viáveis e a medida de absorbância para esta cepa. Assim, esse gráfico apresenta a seguinte correlação: S₀ com Abs de 2,31 e *UFC médio / ml* de 1,04x10¹¹, S₁ com Abs de 1,93 e *UFC médio / ml* de 9,44x10¹⁰, S₂ com Abs de 1,39 e *UFC médio / ml* de 6,74x10¹⁰, S₃ com Abs de 0,78 e *UFC médio / ml* de 2,68x10¹⁰, S₄ com Abs de 0,37 e *UFC médio / ml* de 1,10x10¹⁰, S₅ com Abs de 0,18 e *UFC médio / ml* de 3,44x10⁹, S₆ com Abs de 0,09 e *UFC médio / ml* de 2,02x10⁹ e S₇ com Abs de 0,05 e *UFC médio / ml* de 6,07x10⁸. 118

Gráfico 22- Logaritmo que estabelece a relação direta entre as medidas médias das quadruplas de absorvância e a contagem média das unidades formadoras de colônias por ml (*UFC médio / ml*). Para construir este gráfico os dados foram retirados dos Gráfico 34 e Gráfico 35 do Gráficos das médias das absorvâncias das diluições sequenciais do tipo S da bactéria *S. aureus*. Nele, observa-se uma relação linear entre as médias das medidas de Absorvância (Abs) em 600 nm e *UFC / ml*, estabelecendo assim uma forma indireta de contagem de células viáveis e a medida de absorvância. Dessa forma esse gráfico apresenta a seguinte correlação: S₀ com Abs de 2,31 e *UFC médio / ml* de 1,04x10¹¹, S₁ com Abs de 1,93 e *UFC médio / ml* de 9,44x10¹⁰, S₂ com Abs de 1,39 e *UFC médio / ml* de 6,74x10¹⁰, S₃ com Abs de 0,78 e *UFC médio / ml* de 2,68x10¹⁰, S₄ com Abs de 0,37 e *UFC médio / ml* de 1,10x10¹⁰, S₅ com Abs de 0,18 e *UFC médio / ml* de 3,44x10⁹, S₆ com Abs de 0,09 e *UFC médio / ml* de 2,02x10⁹ e S₇ com Abs de 0,05 e *UFC médio / ml* de 6,07x10⁸. 120

Gráfico 23 -Logaritmo que estabelece a relação direta entre as medidas médias das quadruplas de absorvância e a contagem média das unidades formadoras de colônias por ml (*UFC médio / ml*). Para construir este gráfico os dados foram retirados dos Gráfico 36 e Gráfico 37 do Gráficos das absorvâncias das diluições sequenciais da bactéria *S. mutans*. Nele, observa-se uma relação linear entre as médias das medidas de Absorvância (Abs) em 600 nm e *UFC / ml*, estabelecendo assim uma forma indireta de contagem de células viáveis e a medida de absorvância. Dessa forma esse gráfico apresenta a seguinte correlação: S₀ com Abs de 2,36 e *UFC médio / ml* de 8,43x10¹⁰, S₁ com Abs de 1,99 e *UFC médio / ml* de 3,43x10¹⁰, S₂ com Abs de 1,48 e *UFC médio / ml* de 1,22x10¹⁰, S₃ com Abs de 0,78 e *UFC médio / ml* de 6,93x10⁹, S₄ com Abs de 0,42 e *UFC médio / ml* de 2,19x10⁹, S₅ com Abs de 0,23 e *UFC médio / ml* de 5,55x10⁸, S₆ com Abs de 0,17 e *UFC médio / ml* de 4,63x10⁷ e S₇ com Abs de 0,07 e *UFC médio / ml* de 3,39x10⁷. 121

Gráfico 24- Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das médias das triplicatas biológicas das diferentes diluições S referente às diferentes concentrações do sobrenadante do caldo bacteriano lavado da *E. coli*, com uma alíquota de 3 μl , em cada uma das diluições S, retiradas das soluções stock de 10 $\frac{mg}{ml}$ da curcumina Sigma preparada em solução de etanol, na concentração final de 55,1 μM por microtubo de 1,5 ml. Empreende-se inicialmente deste gráfico que todas as curvas médias apresentam os picos característicos da presença da curcumina Sigma no comprimento de onda de 425 nm, além disso, salienta-se dois diferentes regimes de curvas de absorvância ao considerarmos os espalhamentos para os comprimentos de onda entre 600 nm e 1000 nm. Um característico da bactéria *E. coli* para as curvas médias S_0 , S_1 e S_2 , que tem a lei de formação na equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1.7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, em que S_1 , por exemplo, apresenta a equação $A(\lambda) = 2,2 \times 10^4 \cdot \lambda^{-1.8} + 5,0 \times 10^7 \cdot \lambda^{-4}$ e com espalhamentos característicos de partículas pequenas e índices de λ de $-1,8$ e -4 . O outro regime com para as curvas médias S_3 , S_4 , S_5 , S_6 , e S_7 , com a lei de formação na equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-0.7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, com, por exemplo, S_4 de equação $A(\lambda) = 1,45 \cdot \lambda^{-0.7} + 1,0 \times 10^9 \cdot \lambda^{-4}$ com espalhamentos que aproximam-se da curva média Sigma em PBS de equação $A(\lambda) = 0,2015 \cdot \lambda^{-0.3}$ e com espalhamentos característicos de partículas pequenas e índices de λ de $-0,7$ e -4 . Além disso, nota-se que conforme as concentrações do caldo bacteriano lavado vão diminuindo as curvas de absorvância também vão, uma vez que quanto maior for a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes no meio. 124

Gráfico 25- Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das curvas médias transladadas em relação ao eixo y obtidas do Gráfico 24. Observa-se que ao realizar o translado das curvas, no comprimento de onda de 575,71 nm e absorvância de 0,0323, todas as curvas passam por este ponto específico permitindo-se com isso desprezar o ruído de fundo gerado a partir do comprimento de onda de 575,71 nm para as futuras análises, por se tratar de uma região em que o espalhamento se deve à formação de clusters e aglomerados particulares como tratado no subcapítulo 1.1 Caracterização óptica das curcuminas. Além disso, tem-se que ao transladar essas curvas há uma inversão do posicionamento de cada uma delas em relação à originalmente traçada. Note que a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_0 que aparecia em primeiro, de cima para baixo, no Gráfico 24, agora aparece em último, sendo a mais próxima da curva de referência, e a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_7 que aparecia em último, de cima para baixo, no Gráfico 24, agora está em primeiro, ou seja, em relação à reta de referência esta é a mais distante..... 127

Gráfico 26- Monologarítmo resultante da análise dos picos, no comprimento de onda de 425 nm, das curvas transladadas apresentadas no Gráfico 25. Observa-se dois regimes significativos em relação ao comportamento da quantidade de curcumina Sigma que interagiu com a *E. coli*, durante os 5 minutos de incorporação no escuro e os 10 minutos seguintes de centrifugação, que estão representados pelas retas tracejadas em preto. A curva (a) mostra um regime de acentuado de crescimento da absorbância relativa referente à curcumina livre no sobrenadante a partir da diluição S_3 e até a diluição S_7 , uma situação que já era esperada na medida em que conforme há uma diminuição significativa das quantidades de bactérias no caldo lavado devido ao processo de diluição ocorre um aumento natural da concentração de curcumina Sigma que não interagiu com a *E. coli* devido essa diminuição de bactérias no caldo. A curva (b) apresenta uma pequena variação da quantidade de curcumina Sigma livre no meio, apresentada pela variação da absorbância de 0,02 até 0,04, entre as diluições S_0 e S_3 . Isso ocorre devido à grande quantidade de bactérias no meio que acabam interagindo com a curcumina Sigma, restando então pouca curcumina livre no sobrenadante, fazendo com a absorbância pouco varie. A curva em vermelho representa o ajuste não linear da curva com as diluições de S_0 à S_7 , e mostra de maneira natural como se dá o comportamento oposto da relação Sigma-*E.coli*. Conforme a concentração de curcumina-bactéria diminui a quantidade de curcumina livre no meio aumenta. E no ponto da curva de diluição S_3 , tem-se o ponto de transição entre os regimes da concentração de bactérias no meio e a disponibilidade de curcumina livre. 129

Gráfico 27 -Monologarítmo construído com as informações do Gráfico 26, para o eixo das ordenadas obtido pela correlação das absorbâncias relativas no comprimento de onda de 425 nm do sobrenadante contendo curcumina Sigma livre com a concentração molar do Gráfico 1-b, e o eixo das abscissas obtido pelas informações dos Gráfico 39, apêndice 0, e Gráfico 19 que correlacionados formaram o Gráfico 38, apêndice 0, em que se usou para fazer a leitura do caldo bacteriano de controle do experimento sem adição de curcumina e preparado pelo processo de diluições do tipo S. Evidenciam-se dois regimes para as diferentes concentrações molares de curcumina Sigma livre que estão representados pelas linhas tracejadas em preto. A curva (a) representa uma pequena variação da concentração molar da curcumina livre do sobrenadante de, aproximadamente, $1,12 \mu M$, S_0 , para $1,6 \mu M$, S_3 , em uma variação de UFC médio / ml de $1,24 \times 10^{10}$ para $1,85 \times 10^9$, respectivamente, de S_0 para S_3 . A curva (b) mostra uma grande variação da concentração molar da curcumina Sigma livre no sobrenadante de, aproximadamente, $1,6 \mu M$ em S_3 para $7,83 \mu M$ em S_7 , acompanhada por certa linearidade pela variação do UFC médio / ml de $1,85 \times 10^9$ em S_3 para $5,55 \times 10^7$ em S_7 . Com isso, pode-se afirmar que próximo ao ponto de diluição S_3 ocorre a transição dos diferentes regimes descritos tendo à direita de T uma pequena variação da concentração molar da curcumina Sigma livre que não interagiu com a grande concentração bacteriana entre 10^{10} e 10^{11} , e à

- esquerda uma maior variação da concentração de curcumina Sigma livre que não interagiu com a quantidade de bactérias que variou da ordem de 10^{10} para 10^8 132
- Gráfico 28-Monologarítmo da concentração molar relativa das diferentes soluções de curcumina, Sigma, Natural e Sintética no sobrenadante do caldo lavado da *E. coli* das diluições S pelo relativo UFC médio / ml. Este gráfico foi obtido pela composição da leitura e análise dos gráficos: Gráfico 27, Gráfico 43 e Gráfico 47. Comparando a interação das três curcuminas com a bactéria *E. coli* observamos notadamente que a melhor interação que ocorreu foi a da Sigma-*E.coli*, uma vez que esta apresenta a menor concentração molar de curcumina livre no sobrenadante, curva *d*, dando o indício de que em todas as etapas do processo de diluições S ocorreram interações significativas de curcumina-bactéria, tendo comportamento semelhante para a Sintética-*E.coli*. Já a curcumina Natural, curvas *a* e *b*, apresentou uma menor interação com a *E. coli*. 135
- Gráfico 29- Monologarítmo da concentração molar relativa das diferentes soluções de curcumina, Sigma, Natural e Sintética no sobrenadante do caldo lavado da *S. aureus* das diluições S pelo relativo UFC médio / ml. Este gráfico foi obtido pela composição da leitura e análise dos gráficos Gráfico 53, Gráfico 57 e Gráfico 61, e que estão, respectivamente, nos apêndices 0, 0 e 0. Notamos pelas curvas *b* e *c*, que as curcuminas Sigma e Sintética apresentaram a menor concentração molar de curcumina livre no meio, comportamentos semelhantes de interação e que a interação Sigma-*S.aureus* representou a melhor interação curcumina-bactéria. É possível observar pelas curvas *a* e *d* que as transições entre os regimes de cada curva se dá entre as diluições S_2 e S_3 . E, nota-se que para os grandes UFC médios relativos, S_0 e S_1 , as interações Sigma-*S.aureus*, Natural-*S. aureus* e Sintética-*S.aureus* apresentam comportamento semelhante. 137
- Gráfico 30-Monologarítmo da concentração molar relativa das diferentes soluções de curcumina, Sigma, Natural e Sintética no sobrenadante do caldo lavado da *S. mutans* das diluições S pelo relativo UFC médio / ml. Este gráfico foi obtido pela composição da leitura e análise dos gráficos Gráfico 67, Gráfico 71 e Gráfico 75, e que estão, respectivamente, nos apêndices 0, 0 e 0. Temos pela curva *a* que a interação Natural-*S.mutans* apresentou-se durante todo o processo das diluições S a maior variação na concentração de curcumina livre entre as três. Notamos pelas curvas *c* e *b* que as interações Sigma-*S.mutans* e Sintética-*S.mutans* apresentaram variações de concentração em regimes distintos e que o comportamento dessa interação entre as diluições S_0 e S_3 ocorrem de maneira semelhante ao regime da Natural-*S.mutans*. Observamos pela curva *c* que apresenta a menor concentração molar de curcumina Sigma livre no sobrenadante, que a interação Sigma-*S.mutans* representou a melhor interação curcumina-bactéria quando comparadas com as das curcuminas Natural e Sintética. 139

Gráfico 31-Monologarítmo da concentração molar relativa das soluções de curcumina Sigma livre nos sobrenadantes dos diferentes caldos lavados das bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *S. mutans* das diluições S pelo relativo UFC médio / ml. Nesse gráfico observa-se dois regimes distintos de interação curcumina-bactéria. Um com maior variação na concentração molar relativa da curcumina livre para a bactéria *E. coli*, curvas *a* e *b*, e outro com menor variação na concentração molar relativa de curcumina livre para as bactérias *S. aureus* e *S. mutans*, curva *c*. 141

Gráfico 32-Monologarítmo da concentração molar relativa das soluções de curcumina Natural livre nos sobrenadantes dos diferentes caldos lavados das bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *S. mutans* das diluições S pelo relativo UFC médio / ml. Neste gráfico pode se observar um comportamento não homogêneo da variação das concentrações molares relativas para cada uma das bactérias mas que ao todo segue uma certa linearidade ao longo das diluições S, e que vão se aproximando mostrando regimes semelhantes de comportamento para concentrações entre as diluições de S_0 até S_4 , para as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, e até S_3 para a *S. mutans*. 142

Gráfico 33- Monologarítmo da concentração molar relativa das soluções de curcumina Sintética livre nos sobrenadantes dos diferentes caldos lavados das bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *S. mutans* das diluições S pelo relativo UFC médio / ml. 143

Gráfico 34-Médias das medidas de absorvância das amostras preparadas do caldo bacteriano da *S. aureus* lavado por 3 vezes e submetido a uma série de 7 diluições sequenciais de 50 % , sendo a primeira, solução inicial, S_0 ,com 100 % da amostra do caldo lavada, a segunda amostra, S_1 , com $\frac{1}{2}$ da S_0 , a terceira amostra, S_2 , com $\frac{1}{4}$ da S_0 , a quarta amostra, S_3 , com $\frac{1}{8}$ da S_0 , a quinta amostra, S_4 , com $\frac{1}{16}$ da S_0 , a sexta amostra, S_5 , com $\frac{1}{32}$ da S_0 , a sétima amostra, S_6 , com $\frac{1}{64}$ da S_0 , e por fim, a oitava amostra, S_7 , com $\frac{1}{128}$ da S_0 . Empreende-se deste gráfico que as curvas referentes às diluições seguem a equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1.7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$ apresentada para espalhamentos característicos de partículas pequenas com índices de λ de $-1,7$ e de -4 já relatado anteriormente para a bactéria *S. aureus* na subseção 1.4.1 Nota-se que o comportamento das curvas começa a homogeneizar-se, tende a aproximar-se, em 600 nm, a partir da curva S_3 próximo à absorvância de 1, apresentando características semelhantes para menores comprimentos de onda. Observa-se também que conforme a diluição do caldo lavado aumenta a curva de absorvância diminui, uma característica já esperada, ao passo que quanto maior a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes na solução. ... 155

Gráfico 35- Logarítmico obtido das respectivas absorvâncias do Gráfico 19 retiradas no comprimento de onda de 600 nm para cada curva média de absorvância medida de cada diluição S e correlacionada às médias da contagem das unidades formadoras de colônias por ml (*UFC médio / ml*). Neste gráfico é possível estabelecer uma relação direta entre a média da quadrupla das absorvâncias de cada amostra S e seu *UFC médio / ml*. A linearidade apresentada entre as diluições S₂ e S₇ pelas medidas das médias das absorvâncias também é observada pelas contagens das unidades formadoras de colônias..... 156

Gráfico 36- Médias das medidas de absorvância das amostras preparadas do caldo bacteriano da *S. mutans* lavado por 3 vezes e submetido a uma série de 7 diluições sequenciais de 50 % , sendo a primeira, solução inicial, S₀ ,com 100 % da amostra do caldo lavada, a segunda amostra, S₁ , com $\frac{1}{2}$ da S₀, a terceira amostra, S₂ , com $\frac{1}{4}$ da S₀, a quarta amostra, S₃ , com $\frac{1}{8}$ da S₀, a quinta amostra, S₄ , com $\frac{1}{16}$ da S₀, a sexta amostra, S₅ , com $\frac{1}{32}$ da S₀, a sétima amostra, S₆ , com $\frac{1}{64}$ da S₀, e por fim, a oitava amostra, S₇ , com $\frac{1}{128}$ da S₀. Empreende-se deste gráfico que as curvas referentes às diluições seguem a equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$ apresentada para espalhamentos característicos de partículas pequenas com índices de λ de -1,7 e de -4 já relatado anteriormente para a bactéria *S. mutans* na subseção 1.4.1 Nota-se que o comportamento das curvas começa a homogeneizar-se, tende a aproximar-se, em 600 nm, a partir da curva S₃ próximo à absorvância de 1, apresentando características semelhantes para menores comprimentos de onda. Observa-se também que conforme a diluição do caldo lavado aumenta a curva de absorvância diminui, uma característica já esperada, ao passo que quanto maior a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes na solução.... 157

Gráfico 37- Logarítmico obtido das respectivas absorvâncias do Gráfico 19 retiradas no comprimento de onda de 600 nm para cada curva média de absorvância medida de cada diluição S e correlacionada às médias da contagem das unidades formadoras de colônias por ml (*UFC médio / ml*). Neste gráfico é possível estabelecer uma relação direta entre a média da quadrupla das absorvâncias de cada amostra S e seu *UFC médio / ml*. A linearidade apresentada entre as diluições S₂ e S₇ pelas medidas das médias das absorvâncias também é observada pelas contagens das unidades formadoras de colônias..... 158

Gráfico 38- Logaritmo que estabelece a relação direta entre as medidas médias das quadruplas de absorbância e o *UFC médio* / ml trabalhado com a bactéria *Escherichia coli*. Para construir este gráfico os dados foram retirados dos Gráfico 19 e Gráfico 20. Observa-se uma relação linear entre as médias das medidas de absorbância tanto em 425 nm quanto em 600 nm e *UFC* / ml, estabelecendo assim uma forma indireta de contagem de células viáveis e a medida de absorbância para esta cepa nestes dois comprimentos de onda..... 159

Gráfico 39- Monologaritmo dos espectros de Absorbância na região espectral UV-Vis das médias das medidas de absorbância das triplicatas biológicas da *E. coli* submetido a uma série de 7 diluições sequenciais de 50 %, sendo a primeira, solução inicial, S_0 , com 100 % da amostra do caldo lavado, a segunda amostra, S_1 , com $\frac{1}{2}$ da S_0 , a terceira amostra, S_2 , com $\frac{1}{4}$ da S_0 , a quarta amostra, S_3 , com $\frac{1}{8}$ da S_0 , a quinta amostra, S_4 , com $\frac{1}{16}$ da S_0 , a sexta amostra, S_5 , com $\frac{1}{32}$ da S_0 , a sétima amostra, S_6 , com $\frac{1}{64}$ da S_0 , e por fim, a oitava amostra, S_7 , com $\frac{1}{128}$ da S_0 . Empreende-se deste gráfico que as curvas referentes às diluições seguem a equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$ apresentada para espalhamentos característicos de partículas pequenas com índices de λ de $-1,7$ e de -4 já relatado para a *E. coli* na subseção 1.4.1. Observa-se que conforme a diluição do caldo lavado aumenta a curva de absorbância diminui, uma característica já esperada, ao passo que quanto maior a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes na solução. 160

Gráfico 40- Monologaritmo dos espectros de absorbância na região espectral UV-Vis das médias das triplicatas biológicas das diferentes diluições S referente às diferentes concentrações do sobrenadante do caldo bacteriano lavado da *E. coli*, com uma alíquota de $3 \mu l$, em cada uma das diluições S , retiradas das soluções stock de $10 \frac{mg}{ml}$ da curcumina Natural preparada em solução de etanol, na concentração final de $57,4 \mu M$ por microtubo de 1,5 ml. Empreende-se que todas as curvas médias apresentam os picos característicos da presença da curcumina Natural no comprimento de onda de 425 nm, além disso, salienta-se dois diferentes regimes de curvas de absorbância ao considerarmos os espalhamentos para os comprimentos de onda entre 600 nm e 1000 nm. Um característico da bactéria *E. coli* para as curvas médias S_0 , S_1 e S_2 , que tem a lei de formação na equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, em que S_1 , por exemplo, apresenta a equação $A(\lambda) = 1,9 \times 10^4 \cdot \lambda^{-1,7} + 5,0 \times 10^7 \cdot \lambda^{-4}$ e com espalhamentos característicos de partículas pequenas e índices de λ de $-1,7$ e -4 . Além disso, nota-se que conforme as concentrações do caldo bacteriano lavado vão diminuindo as curvas de absorbância também vão, uma vez que quanto maior for a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes no meio..... 161

- Gráfico 41- Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das curvas médias transladadas em relação ao eixo y obtidas do anexo 0. Observa-se que ao realizar o traslado das curvas, no comprimento de onda de $585,43 \text{ nm}$ e absorvância de $0,0693$, todas as curvas passam por este ponto específico permitindo-se com isso desprezar o ruído de fundo gerado a partir do comprimento de onda de $575,71 \text{ nm}$ para as futuras análises, por se tratar de uma região em que o espalhamento se deve à formação de *clusters* e aglomerados particulares como tratado no subcapítulo 1.1 Caracterização óptica das curcuminas. Além disso, tem-se que ao transladar essas curvas há uma inversão do posicionamento de cada uma delas em relação à originalmente traçada. Note que a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_0 que aparecia em primeiro, de cima para baixo, no anexo 0, agora aparece em último, sendo a mais próxima da curva de referência, e a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_7 que aparecia em último, de cima para baixo, no anexo 0, agora está em primeiro, ou seja, em relação à reta de referência esta é a mais distante..... 162
- Gráfico 42- Monologarítmo resultante da análise dos picos, no comprimento de onda de 425 nm , das curvas transladadas apresentadas no Gráfico 41. Observa-se dois regimes significativos em relação ao comportamento da quantidade de curcumina Natural que interagiu com a *E. coli*, que estão representados pelas retas tracejadas em preto. A curva (b) mostra um regime de acentuado de crescimento da absorvância relativa referente à curcumina livre no sobrenadante a partir da diluição S_3 e até a diluição S_7 . A curva (a) apresenta uma pequena variação da quantidade de curcumina Natural livre no meio, apresentada pela variação da absorvância de $0,07$ até $0,01$, entre as diluições S_0 e S_3 163
- Gráfico 43- Monologarítmo construído com as informações do Gráfico 42, para o eixo das ordenadas obtido pela correlação das absorvâncias relativas no comprimento de onda de 425 nm do sobrenadante contendo curcumina Natural livre com a concentração molar do Gráfico 1-b, e o eixo das abscissas obtido pelas informações do Gráfico 38, apêndice 0. Evidenciam-se dois regimes para as diferentes concentrações molares de curcumina Sigma livre que estão representados pelas linhas tracejadas em preto. A curva (a) representa uma pequena variação da concentração molar da curcumina livre do sobrenadante de, aproximadamente, $0,29 \mu\text{M}$, S_0 , para $1,3 \mu\text{M}$, S_3 , em uma variação de UFC médio / ml de $1,24 \times 10^{10}$ para $1,85 \times 10^9$, respectivamente, de S_0 para S_3 . A curva (b) mostra uma grande variação da concentração molar da curcumina Sigma livre no sobrenadante de, aproximadamente, $1,3 \mu\text{M}$ em S_3 para $6,6 \mu\text{M}$ em S_7 , acompanhada por certa linearidade pela variação do UFC médio / ml de $1,85 \times 10^9$ em S_3 para $5,55 \times 10^7$ em S_7 164

Gráfico 44- Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das médias das triplicatas biológicas das diferentes diluições S referente às diferentes concentrações do sobrenadante do caldo bacteriano lavado da *E. coli*, com uma alíquota de 3 μ l , em cada uma das diluições S, retiradas das soluções stock de 10 $\frac{mg}{ml}$ da curcumina Natural preparada em solução de etanol, na concentração final de 54,3 μ M por microtubo de 1,5 ml. Empreende-se que todas as curvas médias apresentam os picos característicos da presença da curcumina Sintética no comprimento de onda de 425 nm, além disso, salienta-se dois diferentes regimes de curvas de absorvância ao considerarmos os espalhamentos para os comprimentos de onda entre 600 nm e 1000 nm. Um característico da bactéria *E. coli* para as curvas médias S_0 , S_1 e S_2 , que tem a lei de formação na equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, em que S_1 , por exemplo, apresenta a equação $A(\lambda) = 1,9 \times 10^4 \cdot \lambda^{-1,7} + 5,0 \times 10^7 \cdot \lambda^{-4}$ e com espalhamentos característicos de partículas pequenas e índices de λ de -1,7 e -4. Além disso, nota-se que conforme as concentrações do caldo bacteriano lavado vão diminuindo as curvas de absorvância também vão, uma vez que quanto maior for a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes no meio..... 165

Gráfico 45 –Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das curvas médias transladadas em relação ao eixo y obtidas do anexo 0. Observa-se que ao realizar o translado das curvas, no comprimento de onda de 573,13 nm e absorvância de 0,0235, todas as curvas passam por este ponto específico permitindo-se com isso desprezar o ruído de fundo gerado a partir do comprimento de onda de 573,13 nm para as futuras análises, por se tratar de uma região em que o espalhamento se deve à formação de clusters e aglomerados particulares como tratado no subcapítulo 1.1 Caracterização óptica das curcuminas. Além disso, tem-se que ao transladar essas curvas há uma inversão do posicionamento de cada uma delas em relação à originalmente traçada. Note que a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_0 que aparecia em primeiro, de cima para baixo, no anexo 0, agora aparece em último, sendo a mais próxima da curva de referência, e a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_7 que aparecia em último, de cima para baixo, no anexo 0, agora está em primeiro, ou seja, em relação à reta de referência esta é a mais distante..... 166

- Gráfico 46- Monologarítmo resultante da análise dos picos, no comprimento de onda de 425 nm, das curvas transladadas apresentadas no Gráfico 45. Observa-se dois regimes significativos em relação ao comportamento da quantidade de curcumina Sintética que interagiu com a *E. coli*, que estão representados pelas retas tracejadas em preto. A curva (b) mostra um regime de acentuado de crescimento da absorbância relativa referente à curcumina livre no sobrenadante a partir da diluição S_3 e até a diluição S_7 . A curva (b) apresenta uma pequena variação da quantidade de curcumina Natural livre no meio, apresentada pela variação da absorbância de 0,07 até 0,01, entre as diluições S_0 e S_3 167
- Gráfico 47- Monologarítmo construído com as informações do Gráfico 42, para o eixo das ordenadas obtido pela correlação das absorbâncias relativas no comprimento de onda de 425 nm do sobrenadante contendo curcumina Natural livre com a concentração molar do Gráfico 1-b, e o eixo das abscissas obtido pelas informações do Gráfico 38, apêndice 0. Evidenciam-se dois regimes para as diferentes concentrações molares de curcumina Sigma livre que estão representados pelas linhas tracejadas em preto. A curva (a) representa uma pequena variação da concentração molar da curcumina livre do sobrenadante de, aproximadamente, $0,11 \mu M$, S_0 , para $0,34 \mu M$, S_3 , em uma variação de UFC médio / ml de $1,24 \times 10^{10}$ para $1,85 \times 10^9$, respectivamente, de S_0 para S_3 . A curva (b) mostra uma grande variação da concentração molar da curcumina Sigma livre no sobrenadante de, aproximadamente, $0,34 \mu M$ em S_3 para $4,6 \mu M$ em S_7 , acompanhada por certa linearidade pela variação do UFC médio / ml de $1,85 \times 10^9$ em S_3 para $5,55 \times 10^7$ em S_7 168
- Gráfico 48- Logaritmo que estabelece a relação direta entre as medidas médias das quadruplas de absorbância e o UFC médio / ml trabalhado com a bactéria *Staphylococcus aureus*. Para construir este gráfico os dados foram retirados dos Gráfico 35 e Gráfico 22. Observa-se uma relação linear entre as médias das medidas de absorbância tanto em 425 nm quanto em 600 nm e UFC / ml, estabelecendo assim uma forma indireta de contagem de células viáveis e a medida de absorbância para esta cepa nestes dois comprimentos de onda..... 169
- Gráfico 49- Monologarítmo dos espectros de Absorbância na região espectral UV-Vis das médias das medidas de absorbância das triplicatas biológicas da *S. aureus* submetido a uma série de 7 diluições sequenciais de 50 %, sendo a primeira, solução inicial, S_0 , com 100 % da amostra do caldo lavado, a segunda amostra, S_1 , com $\frac{1}{2}$ da S_0 , a terceira amostra, S_2 , com $\frac{1}{4}$ da S_0 , a quarta amostra, S_3 , com $\frac{1}{8}$ da S_0 , a quinta amostra, S_4 , com $\frac{1}{16}$ da S_0 , a sexta amostra, S_5 , com $\frac{1}{32}$ da S_0 , a sétima amostra, S_6 , com $\frac{1}{64}$ da S_0 , e por fim, a oitava amostra, S_7 , com $\frac{1}{128}$ da S_0 . Empreende-se deste gráfico que as curvas referentes às diluições seguem a equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$ apresentada para espalhamentos característicos de partículas pequenas com índices de

λ de $-1,7$ e de -4 já relatado para a *S. aureus* na subseção 1.4.1. Observa-se que conforme a diluição do caldo lavado aumenta a curva de absorvância diminui, uma característica já esperada, ao passo que quanto maior a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes na solução. 170

Gráfico 50- Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das médias das triplicatas biológicas das diferentes diluições S referente às diferentes concentrações do sobrenadante do caldo bacteriano lavado da *S. aureus*, com uma alíquota de $3 \mu l$, em cada uma das diluições S , retiradas das soluções stock de $10 \frac{mg}{ml}$ da curcumina Sigma preparada em solução de etanol, na concentração final de $55,1 \mu M$ por microtubo de $1,5 ml$. Empreende-se que todas as curvas médias apresentam os picos característicos da presença da curcumina Sigma no comprimento de onda de $425 nm$, além disso, salienta-se dois diferentes regimes de curvas de absorvância ao considerarmos os espalhamentos para os comprimentos de onda entre $600 nm$ e $1000 nm$. Um característico da bactéria *S. aureus* para as curvas médias S_0 , S_1 e S_2 , que tem a lei de formação na equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, em que S_1 , por exemplo, apresenta a equação $A(\lambda) = 2,35 \times 10^4 \cdot \lambda^{-1,8} + 5,0 \times 10^7 \cdot \lambda^{-4}$ e com espalhamentos característicos de partículas pequenas e índices de λ de $-1,8$ e -4 . Além disso, nota-se que conforme as concentrações do caldo bacteriano lavado vão diminuindo as curvas de absorvância também vão, uma vez que quanto maior for a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes no meio. 171

Gráfico 51- Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das curvas médias transladadas em relação ao eixo y obtidas do anexo 0. Observa-se que ao realizar o translado das curvas, no comprimento de onda de $580,13 nm$ e absorvância de $0,0135$, todas as curvas passam por este ponto específico permitindo-se com isso desprezar o ruído de fundo gerado a partir do comprimento de onda de $580,13 nm$ para as futuras análises, por se tratar de uma região em que o espalhamento se deve à formação de *clusters* e aglomerados particulares como tratado no subcapítulo 1.1 Caracterização óptica das curcuminas. Além disso, tem-se que ao transladar essas curvas há uma inversão do posicionamento de cada uma delas em relação à originalmente traçada. Note que a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_0 que aparecia em primeiro, de cima para baixo, no anexo 0, agora aparece em último, sendo a mais próxima da curva de referência, e a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_7 que aparecia em último, de cima para baixo, no anexo 0, agora está em primeiro, ou seja, em relação à reta de referência esta é a mais distante. 172

Gráfico 52- Monologarítmo resultante da análise dos picos, no comprimento de onda de 425 nm, das curvas transladadas apresentadas no Gráfico 51. Observa-se dois regimes significativos em relação ao comportamento da quantidade de curcumina Sigma que interagiu com a *S.aureus*, que estão representados pelas retas tracejadas em preto. A curva (a) mostra um regime de acentuado de crescimento da absorbância relativa referente à curcumina livre no sobrenadante a partir da diluição S_3 e até a diluição S_7 . A curva (b) apresenta uma pequena variação da quantidade de curcumina Sigma livre no meio, apresentada pela variação da absorbância de 0,005 até 0,05, entre as diluições S_0 e S_3 173

Gráfico 53- Monologarítmo construído com as informações do Gráfico 42, para o eixo das ordenadas obtido pela correlação das absorbâncias relativas no comprimento de onda de 425 nm do sobrenadante contendo curcumina Sigma livre com a concentração molar do Gráfico 1-b, e o eixo das abscissas obtido pelas informações do Gráfico 48, apêndice 0. Evidenciam-se dois regimes para as diferentes concentrações molares de curcumina Sigma livre que estão representados pelas linhas tracejadas em preto. A curva (a) representa uma pequena variação da concentração molar da curcumina livre do sobrenadante de, aproximadamente, $0,09 \mu M$, S_0 , para $0,98 \mu M$, S_3 , em uma variação de UFC médio / ml de $2,73 \times 10^{10}$ para $3,09 \times 10^9$, respectivamente, de S_0 para S_3 . A curva (b) mostra uma grande variação da concentração molar da curcumina Sigma livre no sobrenadante de, aproximadamente, $0,98 \mu M$ em S_3 para $2,12 \mu M$ em S_7 , acompanhada por certa linearidade pela variação do UFC médio / ml de $3,09 \times 10^9$ em S_3 para $1,07 \times 10^7$ em S_7 174

Gráfico 54- Monologarítmo dos espectros de absorbância na região espectral UV-Vis das médias das triplicatas biológicas das diferentes diluições S referente às diferentes concentrações do sobrenadante do caldo bacteriano lavado da *S. aureus*, com uma alíquota de $3 \mu l$, em cada uma das diluições S, retiradas das soluções stock de $10 \frac{mg}{ml}$ da curcumina Natural preparada em solução de etanol, na concentração final de $55,1 \mu M$ por microtubo de 1,5 ml. Empreende-se que todas as curvas médias apresentam os picos característicos da presença da curcumina Natural no comprimento de onda de 425 nm, além disso, salienta-se dois diferentes regimes de curvas de absorbância ao considerarmos os espalhamentos para os comprimentos de onda entre 600 nm e 1000 nm. Um característico da bactéria *S. aureus* para as curvas médias S_0 , S_1 e S_2 , que tem a lei de formação na equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1.7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, em que S_1 , por exemplo, apresenta a equação $A(\lambda) = 2,1 \times 10^4 \cdot \lambda^{-1.8} + 5,0 \times 10^7 \cdot \lambda^{-4}$ e com espalhamentos característicos de partículas pequenas e índices de λ de $-1,8$ e -4 . Além disso, nota-se que conforme as concentrações do caldo bacteriano lavado vão diminuindo as curvas de absorbância também vão, uma vez que quanto maior for a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes no meio. 175

- Gráfico 55- Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das curvas médias transladadas em relação ao eixo y obtidas do anexo 0. Observa-se que ao realizar o traslado das curvas, no comprimento de onda de $720,79 \text{ nm}$ e absorvância de $0,0273$, todas as curvas passam por este ponto específico permitindo-se com isso desprezar o ruído de fundo gerado a partir do comprimento de onda de $720,79 \text{ nm}$ para as futuras análises, por se tratar de uma região em que o espalhamento se deve à formação de *clusters* e aglomerados particulares como tratado no subcapítulo 1.1 Caracterização óptica das curcuminas. Além disso, tem-se que ao transladar essas curvas há uma inversão do posicionamento de cada uma delas em relação à originalmente traçada. Note que a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_0 que aparecia em primeiro, de cima para baixo, no anexo 0, agora aparece em último, sendo a mais próxima da curva de referência, e a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_7 que aparecia em último, de cima para baixo, no anexo 0, agora está em primeiro, ou seja, em relação à reta de referência esta é a mais distante. 176
- Gráfico 56- Monologarítmo resultante da análise dos picos, no comprimento de onda de 425 nm , das curvas transladadas apresentadas no Gráfico 51. Observa-se dois regimes significativos em relação ao comportamento da quantidade de curcumina Sigma que interagiu com a *S.aureus*, que estão representados pelas retas tracejadas em preto. A curva (a) mostra um regime de acentuado de crescimento da absorvância relativa referente à curcumina livre no sobrenadante a partir da diluição S_3 e até a diluição S_7 . A curva (b) apresenta uma pequena variação da quantidade de curcumina Sigma livre no meio, apresentada pela variação da absorvância de $0,009$ até $0,04$, entre as diluições S_0 e S_3 177
- Gráfico 57- Monologarítmo construído com as informações do Gráfico 56, para o eixo das ordenadas obtido pela correlação das absorvâncias relativas no comprimento de onda de 425 nm do sobrenadante contendo curcumina Natural livre com a concentração molar do Gráfico 1-b, e o eixo das abscissas obtido pelas informações do Gráfico 48, apêndice 0. Evidenciam-se dois regimes para as diferentes concentrações molares de curcumina Natural livre que estão representados pelas linhas tracejadas em preto. A curva (a) representa uma pequena variação da concentração molar da curcumina livre do sobrenadante de, aproximadamente, $0,16 \mu\text{M}$, S_0 , para $0,78 \mu\text{M}$, S_3 , em uma variação de UFC médio / ml de $2,73 \times 10^{10}$ para $3,09 \times 10^9$, respectivamente, de S_0 para S_3 . A curva (b) mostra uma grande variação da concentração molar da curcumina Natural livre no sobrenadante de, aproximadamente, $0,78 \mu\text{M}$ em S_3 para $5,73 \mu\text{M}$ em S_7 , acompanhada por certa linearidade pela variação do UFC médio / ml de $3,09 \times 10^9$ em S_3 para $1,07 \times 10^7$ em S_7 178

Gráfico 58- Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das médias das triplicatas biológicas das diferentes diluições S referente às diferentes concentrações do sobrenadante do caldo bacteriano lavado da *S. aureus*, com uma alíquota de 3 μl , em cada uma das diluições S, retiradas das soluções stock de 10 $\frac{mg}{ml}$ da curcumina Sintética preparada em solução de etanol, na concentração final de 55,1 μM por microtubo de 1,5 ml. Empreende-se que todas as curvas médias apresentam os picos característicos da presença da curcumina Sintética no comprimento de onda de 425 nm, além disso, salienta-se dois diferentes regimes de curvas de absorvância ao considerarmos os espalhamentos para os comprimentos de onda entre 600 nm e 1000 nm. Um característico da bactéria *S. aureus* para as curvas médias S_0 , S_1 e S_2 , que tem a lei de formação na equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1.7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, em que S_1 , por exemplo, apresenta a equação $A(\lambda) = 2,6 \times 10^4 \cdot \lambda^{-1.8} + 5,0 \times 10^7 \cdot \lambda^{-4}$ e com espalhamentos característicos de partículas pequenas e índices de λ de -1,8 e -4. Além disso, nota-se que conforme as concentrações do caldo bacteriano lavado vão diminuindo as curvas de absorvância também vão, uma vez que quanto maior for a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes no meio. 179

Gráfico 59- Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das curvas médias transladadas em relação ao eixo y obtidas do anexo 0. Observa-se que ao realizar o translado das curvas, no comprimento de onda de 585,15 nm e absorvância de 0,0197, todas as curvas passam por este ponto específico permitindo-se com isso desprezar o ruído de fundo gerado a partir do comprimento de onda de 585,15 nm para as futuras análises, por se tratar de uma região em que o espalhamento se deve à formação de clusters e aglomerados particulares como tratado no subcapítulo 1.1 Caracterização óptica das curcuminas. Além disso, tem-se que ao transladar essas curvas há uma inversão do posicionamento de cada uma delas em relação à originalmente traçada. Note que a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_0 que aparecia em primeiro, de cima para baixo, no anexo 0, agora aparece em último, sendo a mais próxima da curva de referência, e a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_7 que aparecia em último, de cima para baixo, no anexo 0, agora está em primeiro, ou seja, em relação à reta de referência esta é a mais distante..... 180

Gráfico 60- Monologarítmo resultante da análise dos picos, no comprimento de onda de 425 nm, das curvas transladadas apresentadas no Gráfico 59. Observa-se dois regimes significativos em relação ao comportamento da quantidade de curcumina Sintética que interagiu com a *S.aureus*, que estão representados pelas retas tracejadas em preto. A curva (a) mostra um regime de acentuado de crescimento da absorvância relativa referente à curcumina livre no sobrenadante a partir da diluição S_3 e até a diluição S_7 . A curva (b) apresenta uma pequena variação da quantidade de curcumina Sigma livre no meio,

apresentada pela variação da absorvância de 0,007 até 0,06, entre as diluições S_0 e S_3 181

Gráfico 61- Monologarítmo construído com as informações do Gráfico 60, para o eixo das ordenadas obtido pela correlação das absorvâncias relativas no comprimento de onda de 425 nm do sobrenadante contendo curcumina Sintética livre com a concentração molar do Gráfico 1-b, e o eixo das abscissas obtido pelas informações do Gráfico 48, apêndice 0. Evidenciam-se dois regimes para as diferentes concentrações molares de curcumina Sintética livre que estão representados pelas linhas tracejadas em preto. A curva (a) representa uma pequena variação da concentração molar da curcumina livre do sobrenadante de, aproximadamente, 0,14 μM , S_0 , para 0,48 μM , S_3 , em uma variação de UFC médio / ml de $2,73 \times 10^{10}$ para $3,09 \times 10^9$, respectivamente, de S_0 para S_2 . A curva (b) mostra uma grande variação da concentração molar da curcumina Sintética livre no sobrenadante de, aproximadamente, 0,48 μM em S_2 para 2,74 μM em S_7 , acompanhada por certa linearidade pela variação do UFC médio / ml de $3,09 \times 10^9$ em S_3 para $1,07 \times 10^7$ em S_7 182

Gráfico 62- Logaritmo que estabelece a relação direta entre as medidas médias das quadruplas de absorvância e o UFC médio / ml trabalhado com a bactéria *Streptococcus mutans*. Para construir este gráfico os dados foram retirados dos Gráfico 36 e Gráfico 37. Observa-se uma relação linear entre as médias das medidas de absorvância tanto em 425 nm quanto em 600 nm e UFC / ml, estabelecendo assim uma forma indireta de contagem de células viáveis e a medida de absorvância para esta cepa nestes dois comprimentos de onda. 183

Gráfico 63- Monologarítmo dos espectros de Absorvância na região espectral UV-Vis das médias das medidas de absorvância das triplicatas biológicas da *S. mutans* submetido a uma série de 7 diluições sequenciais de 50 %, sendo a primeira, solução inicial, S_0 , com 100 % da amostra do caldo lavado, a segunda amostra, S_1 , com $\frac{1}{2}$ da S_0 , a terceira amostra, S_2 , com $\frac{1}{4}$ da S_0 , a quarta amostra, S_3 , com $\frac{1}{8}$ da S_0 , a quinta amostra, S_4 , com $\frac{1}{16}$ da S_0 , a sexta amostra, S_5 , com $\frac{1}{32}$ da S_0 , a sétima amostra, S_6 , com $\frac{1}{64}$ da S_0 , e por fim, a oitava amostra, S_7 , com $\frac{1}{128}$ da S_0 . Empreende-se deste gráfico que as curvas referentes às diluições seguem a equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$ apresentada para espalhamentos característicos de partículas pequenas com índices de λ de -1,7 e de -4. Observa-se que conforme a diluição do caldo lavado aumenta a curva de absorvância diminui, uma característica já esperada, ao passo que quanto maior a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes na solução. 184

Gráfico 64- Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das médias das triplicatas biológicas das diferentes diluições S referente às diferentes concentrações do sobrenadante do caldo bacteriano lavado da *S. mutans*, com uma alíquota de $3 \mu l$, em cada uma das diluições S , retiradas das soluções stock de $10 \frac{mg}{ml}$ da curcumina Sigma preparada em solução de etanol, na concentração final de $55,1 \mu M$ por microtubo de 1,5 ml. Empreende-se que todas as curvas médias apresentam os picos característicos da presença da curcumina Sigma no comprimento de onda de 425 nm, além disso, salienta-se dois diferentes regimes de curvas de absorvância ao considerarmos os espalhamentos para os comprimentos de onda entre 600 nm e 1000 nm. Um característico da bactéria *S. aureus* para as curvas médias S_0 , S_1 e S_2 , que tem a lei de formação na equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, em que S_1 , por exemplo, apresenta a equação $A(\lambda) = 2,4 \times 10^4 \cdot \lambda^{-1,8} + 5,0 \times 10^7 \cdot \lambda^{-4}$ e com espalhamentos característicos de partículas pequenas e índices de λ de $-1,8$ e -4 . Além disso, nota-se que conforme as concentrações do caldo bacteriano lavado vão diminuindo as curvas de absorvância também vão, uma vez que quanto maior for a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes no meio. 185

Gráfico 65- Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das curvas médias transladadas em relação ao eixo y obtidas do anexo FF. Observa-se que ao realizar o translado das curvas, no comprimento de onda de $588,10 \text{ nm}$ e absorvância de $0,012$, todas as curvas passam por este ponto específico permitindo-se com isso desprezar o ruído de fundo gerado a partir do comprimento de onda de $588,10 \text{ nm}$ para as futuras análises, por se tratar de uma região em que o espalhamento se deve à formação de *clusters* e aglomerados particulares como tratado no subcapítulo 1.1 Caracterização óptica das curcuminas. Além disso, tem-se que ao transladar essas curvas há uma inversão do posicionamento de cada uma delas em relação à originalmente traçada. Note que a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_0 que aparecia em primeiro, de cima para baixo, no anexo FF, agora aparece em último, sendo a mais próxima da curva de referência, e a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_7 que aparecia em último, de cima para baixo, no anexo FF, agora está em primeiro, ou seja, em relação à reta de referência esta é a mais distante..... 186

Gráfico 66- Monologarítmo resultante da análise dos picos, no comprimento de onda de 425 nm, das curvas transladadas apresentadas no Gráfico 59. Observa-se dois regimes significativos em relação ao comportamento da quantidade de curcumina Sigma que interagiu com a *S. mutans*, que estão representados pelas retas tracejadas em preto. A curva (a) mostra um regime de acentuado de crescimento da absorvância relativa referente à curcumina livre no sobrenadante a partir da diluição S_3 e até a diluição S_7 . A curva (b) apresenta uma pequena variação da quantidade de curcumina Sigma livre no meio,

apresentada pela variação da absorvância de 0,007 até 0,06, entre as diluições S_0 e S_3 187

Gráfico 67- Monologarítmo construído com as informações do Gráfico 60, para o eixo das ordenadas obtido pela correlação das absorvâncias relativas no comprimento de onda de 425 nm do sobrenadante contendo curcumina Sintética livre com a concentração molar do Gráfico 1-b, e o eixo das abscissas obtido pelas informações do Gráfico 48, apêndice P. Evidenciam-se um regime linear para as diferentes concentrações molares de curcumina Sigma livre que está representada pela linha tracejada em preto. A concentração molar da curcumina livre do sobrenadante vai de, aproximadamente, 0,14 μM , S_0 , para 2,0 μM , S_7 , em uma variação de UFC médio / ml de $9,4 \times 10^9$ para $4,3 \times 10^6$, respectivamente, de S_0 para S_7 188

Gráfico 68- Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das médias das triplicatas biológicas das diferentes diluições S referente às diferentes concentrações do sobrenadante do caldo bacteriano lavado da *S. mutans*, com uma alíquota de 3 μl , em cada uma das diluições S , retiradas das soluções stock de 10 $\frac{mg}{ml}$ da curcumina Natural preparada em solução de etanol, na concentração final de 55,1 μM por microtubo de 1,5 ml. Empreende-se que todas as curvas médias apresentam os picos característicos da presença da curcumina Natural no comprimento de onda de 425 nm, além disso, salienta-se dois diferentes regimes de curvas de absorvância ao considerarmos os espalhamentos para os comprimentos de onda entre 600 nm e 1000 nm. Um característico da bactéria *S. mutans* para as curvas médias S_0 , S_1 e S_2 , que tem a lei de formação na equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, em que S_1 , por exemplo, apresenta a equação $A(\lambda) = 2,1 \times 10^4 \cdot \lambda^{-1,8} + 5,0 \times 10^7 \cdot \lambda^{-4}$ e com espalhamentos característicos de partículas pequenas e índices de λ de -1,9 e -4. Além disso, nota-se que conforme as concentrações do caldo bacteriano lavado vão diminuindo as curvas de absorvância também vão, uma vez que quanto maior for a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes no meio..... 189

Gráfico 69- Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das curvas médias transladadas em relação ao eixo y obtidas do anexo II. Observa-se que ao realizar o traslado das curvas, no comprimento de onda de 720,79 nm e absorvância de 0,0273, todas as curvas passam por este ponto específico permitindo-se com isso desprezar o ruído de fundo gerado a partir do comprimento de onda de 720,79 nm para as futuras análises, por se tratar de uma região em que o espalhamento se deve à formação de *clusters* e aglomerados particulares como tratado no subcapítulo 1.1 Caracterização óptica das curcuminas. Além disso, tem-se que ao transladar essas curvas há uma inversão do posicionamento de cada uma delas em relação à originalmente traçada. Note que a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_0 que aparecia em primeiro, de cima para baixo,

no anexo II, agora aparece em último, sendo a mais próxima da curva de referência, e a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_7 que aparecia em último, de cima para baixo, no anexo II, agora está em primeiro, ou seja, em relação à reta de referência esta é a mais distante..... 190

Gráfico 70- Monologarítmo resultante da análise dos picos, no comprimento de onda de 425 nm, das curvas trasladadas apresentadas no Gráfico 51. Observa-se dois regimes significativos em relação ao comportamento da quantidade de curcumina Natural que interagiu com a *S. mutans*, que estão representados pelas retas tracejadas em preto. A curva (a) mostra um regime de acentuado de crescimento da absorvância relativa referente à curcumina livre no sobrenadante a partir da diluição S_3 e até a diluição S_7 . A curva (b) apresenta uma pequena variação da quantidade de curcumina Natural livre no meio, apresentada pela variação da absorvância de 0,009 até 0,04, entre as diluições S_0 e S_3 191

Gráfico 71- Monologarítmo construído com as informações do Gráfico 60, para o eixo das ordenadas obtido pela correlação das absorvâncias relativas no comprimento de onda de 425 nm do sobrenadante contendo curcumina Sintética livre com a concentração molar do Gráfico 1-b, e o eixo das abscissas obtido pelas informações do Gráfico 48, apêndice P. Evidenciam-se um regime linear para as diferentes concentrações molares de curcumina Sigma livre que está representada pela linha tracejada em preto. A concentração molar da curcumina livre do sobrenadante vai de, aproximadamente, 0,12 μM , S_0 , para 6,0 μM , S_7 , em uma variação de UFC médio / ml de $9,4 \times 10^9$ para $4,3 \times 10^6$, respectivamente, de S_0 para S_7 192

Gráfico 72- Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das médias das triplicatas biológicas das diferentes diluições S referente às diferentes concentrações do sobrenadante do caldo bacteriano lavado da *S. mutans*, com uma alíquota de 3 μl , em cada uma das diluições S, retiradas das soluções stock de 10 $\frac{mg}{ml}$ da curcumina Sintética preparada em solução de etanol, na concentração final de 55,1 μM por microtubo de 1,5 ml. Empreende-se que todas as curvas médias apresentam os picos característicos da presença da curcumina Sintética no comprimento de onda de 425 nm, além disso, salienta-se dois diferentes regimes de curvas de absorvância ao considerarmos os espalhamentos para os comprimentos de onda entre 600 nm e 1000 nm. Um característico da bactéria *S. mutans* para as curvas médias S_0 , S_1 e S_2 , que tem a lei de formação na equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, em que S_1 , por exemplo, apresenta a equação $A(\lambda) = 2,1 \times 10^4 \cdot \lambda^{-1,8} + 5,0 \times 10^7 \cdot \lambda^{-4}$ e com espalhamentos característicos de partículas pequenas e índices de λ de -1,9 e -4. Além disso, nota-se que conforme as concentrações do caldo bacteriano lavado vão diminuindo as curvas de absorvância

também vão, uma vez que quanto maior for a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes no meio. 193

Gráfico 73- Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das curvas médias transladadas em relação ao eixo y obtidas do anexo II. Observa-se que ao realizar o traslado das curvas, no comprimento de onda de $585,81 \text{ nm}$ e absorvância de $0,0186$, todas as curvas passam por este ponto específico permitindo-se com isso desprezar o ruído de fundo gerado a partir do comprimento de onda de $585,81 \text{ nm}$ para as futuras análises, por se tratar de uma região em que o espalhamento se deve à formação de *clusters* e aglomerados particulares como tratado no subcapítulo 1.1 Caracterização óptica das curcuminas. Além disso, tem-se que ao transladar essas curvas há uma inversão do posicionamento de cada uma delas em relação à originalmente traçada. Note que a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_0 que aparecia em primeiro, de cima para baixo, no anexo II, agora aparece em último, sendo a mais próxima da curva de referência, e a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_7 que aparecia em último, de cima para baixo, no anexo II, agora está em primeiro, ou seja, em relação à reta de referência esta é a mais distante. 194

Gráfico 74- Monologarítmo resultante da análise dos picos, no comprimento de onda de 425 nm , das curvas transladadas apresentadas no Gráfico 59. Observa-se dois regimes significativos em relação ao comportamento da quantidade de curcumina Sintética que interagiu com a *S.mutans*, que estão representados pelas retas tracejadas em preto. A curva (a) mostra um regime de acentuado de crescimento da absorvância relativa referente à curcumina livre no sobrenadante a partir da diluição S_2 e até a diluição S_7 . A curva (b) apresenta uma pequena variação da quantidade de curcumina Sintética livre no meio, apresentada pela variação da absorvância de $0,05$ até $0,01$, entre as diluições S_0 e S_2 195

Gráfico 75- Monologarítmo construído com as informações do Gráfico 60, para o eixo das ordenadas obtido pela correlação das absorvâncias relativas no comprimento de onda de 425 nm do sobrenadante contendo curcumina Sintética livre com a concentração molar do Gráfico 1-b, e o eixo das abscissas obtido pelas informações do Gráfico 48, apêndice P. Evidenciam-se dois regimes lineares para as diferentes concentrações molares de curcumina Sintética livre que estão representadas pelas linhas tracejadas em preto. A linha (a) com a concentração molar da curcumina livre do sobrenadante vai de, aproximadamente, $2,4 \mu\text{M}$, S_3 , para $3,2 \mu\text{M}$, S_7 , em uma variação de UFC médio / ml de $7,06 \times 10^8$ para $4,3 \times 10^6$, respectivamente, de S_3 para S_7 . A linha (b) com a concentração molar da curcumina livre do sobrenadante vai de, aproximadamente, $0,23 \mu\text{M}$, S_0 , para $2,4 \mu\text{M}$, S_3 , em uma variação de UFC médio / ml de $9,1 \times 10^9$ para $7,06 \times 10^8$, respectivamente, de S_0 para S_3 196

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	45
2	OBJETIVO.....	49
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	51
3.1	<i>Escherichia coli</i>	51
3.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	52
3.3	<i>Streptococcus mutans</i>	54
3.4	Curcumina	55
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
4.1	As amostras de bactérias	59
4.2	As curcuminas utilizadas	59
4.3	Equipamento	60
4.4	Software	61
4.5	Descrição dos experimentos	61
4.5.1	Experimento: Caracterização das curcuminas em etanol.....	61
4.5.2	Experimento: Crescimento das bactérias	62
4.5.3	Experimento: Caracterização da centrifugação	62
4.5.4	Diluição do caldo bacteriano lavado e interação com curcumina	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
5.1	Caracterização óptica das curcuminas.....	65
5.1.1	Curcuminas em etanol.....	66
5.1.2	Estabilidade da curcumina em meio aquoso	69
5.2	Internalização de curcumina em biofilmes.....	80
5.3	Caracterização óptica das bactérias.....	96
5.4	Curvas de crescimento característico das bactérias	103
5.4.1	Curva de crescimento característico da <i>E. coli</i>	104
5.4.2	Curva de crescimento característico da <i>S. aureus</i>	107

5.4.3	Curva de crescimento característico da <i>S. mutans</i>	110
5.5	Quantificação das bactérias	114
5.5.1	Quantificação da bactéria <i>E. coli</i>	114
5.5.2	Quantificação da bactéria <i>S. aureus</i>	119
5.5.3	Quantificação da bactéria <i>S. mutans</i>	121
5.6	Interação entre as curcuminas e as bactérias.....	122
5.6.1	Interação entre a curcumina Sigma e a bactéria <i>E. coli</i>	123
5.6.2	Comparação entre as interações curcumina-bactéria para as curcuminas Sigma, Natural e Sintética com a bactéria <i>E. coli</i>	134
5.6.3	Comparação entre as interações curcumina-bactéria para as curcuminas Sigma, Natural e Sintética com a bactéria <i>S. aureus</i>	136
5.6.4	Comparação entre as interações curcumina-bactéria para as curcuminas Sigma, Natural e Sintética com a bactéria <i>S. mutans</i>	138
5.7	Comparação das interações curcumina-bactéria por tipo de curcumina....	140
5.7.1	Interação da curcumina Sigma com as bactérias <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. mutans</i>	140
5.7.2	Interação da curcumina Natural com as bactérias <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. mutans</i>	142
5.7.3	Interação da curcumina Sintética com as bactérias <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. mutans</i>	143
6	CONCLUSÃO.....	145
	REFERÊNCIA	149
	APÊNDICE.....	155
	ANEXOS	197
	I ATCC – <i>Escherichia coli</i>	197
	II ATCC – <i>Staphylococcus aureus</i>	199
	III ATCC – <i>Streptococcus mutans</i>	201
	IV Curcumina Sigma Audrich	203

1 INTRODUÇÃO

A luz com as suas propriedades curativas fascina a humanidade há muitos milhares de anos. Desde os antigos povos egípcios às culturas orientais o uso da luz para tratar doenças foi amplamente utilizado. Já os gregos cunharam o termo helioterapia para praticar o tratamento de muitas doenças, acreditando – se até que o conceito de adoração ao Sol tenha crescido a partir disso. ¹

Contudo, foi somente no início do século XX que a terapia com luz iniciou a sua escalada sem volta. Tem-se como marco o ano de 1903 em que Niels Ryberg Finsen recebeu o Prêmio Nobel por seus trabalhos do tratamento da tuberculose, e da varíola concomitantemente, com a sua descoberta da Terapia com Luz ².

Sendo ainda, por volta deste mesmo período, que Oscar Raab e seu professor Herman Von Tappeiner descreveram meticulosamente que a ação de agentes fotossensibilizadores na presença de luz e oxigênio poderiam causar a morte de células. ^{1,3}

Entretanto, mesmo cunhando o termo Terapia Fotodinâmica, TFD, também conhecida pelo acrônimo “PDT”, do inglês *Photodynamic Therapy*, ela não conseguiu se mostrar como uma primorosa terapia. Mesmo com o seu grandioso potencial, por não atingir uma quantidade mínima de pessoas para que se sustentasse, enquanto eficiente e inovadora, diante das terapias tradicionais da época, por assim dizer, ficou em estado latente até a metade daquele século. ⁴

Foi então que Richard L. Lipson e sua equipe, Edward J. Baldes e Mary Jane Gray, em dezembro de 1967, publicaram um trabalho sobre um derivado de Hematoporfirina na detecção de vários tipos de tumores malignos em 121 pacientes com suspeita de câncer ⁴, resgatando de forma mais abrangente para um público maior os efeitos incontestáveis da TFD no combate desta que se tornaria uma das doenças mais temíveis, visto que, uma vez que administrada a droga para a detecção ela também era utilizada para o tratamento. ⁴

A TFD consiste fundamentalmente na interação sincronizada da luz, em um comprimento de onda específico, do agente Fotossensibilizador, FS, e do oxigênio molecular presente nas células. Assim que o FS é irradiado pela luz, sendo este proveniente de fontes como lâmpada, *LED* ou lasers, ele reage com este oxigênio

presente na célula promovendo dois tipos de fotoprocessos conhecidos como reações do Tipo 1 e reações do Tipo 2.^{5, 6}

As reações do Tipo 1 são aquelas que envolvem a transferências de cargas do estado tripleto do FS entre, principalmente, as moléculas excitadas pela luz e o oxigênio presentes na célula. Gerando espécies altamente citotóxicas chamadas de íons radicais como hidroxilas, peróxidos, radicais derivados de lipídeos, proteínas, colesterol e outros.^{6, 7}

As reações do Tipo 2 são aquelas que envolvem diretamente a transferência de energia do estado tripleto do FS para o estado tripleto do oxigênio molecular podendo gerar uma espécie altamente reativa de oxigênio, o oxigênio singleto. Este oxigênio singleto é considerado o principal responsável pelos danos fotoquímicos causados na célula por muitos FS.^{6, 8}

Há que se considerar que a especificidade das reações fotoquímicas das quais compõe o propósito da TFD a tornam unicamente seguras e vantajosas devido à dupla seletividade, visto que há um grande controle na administração da droga altamente específica e na pontualidade da entrega da luz que é entregue apenas no lugar onde se quer que ocorra o efeito fotodinâmico.⁵

Desta forma, faz com que a TFD se torne não só uma grande e eficiente técnica de combate às doenças como o câncer ou lesões epidérmicas, mas como também na luta contra microrganismos patógenos como os fungos e as bactérias responsáveis por diversas destas doenças, dando suporte a uma melhora na qualidade de vida.^{6, 9}

Em se tratando da manutenção da vida e do bem-estar, o combate as infecções tem se tornado cada vez mais difícil e trabalhoso devido à diversos fatores como a menor disponibilização de antimicrobianos juntamente com a má administração de antibióticos, ocasionando um aumento significativo do número de bactérias resistentes.⁹

Além disso, o alerta constante e alarmante de organizações não-governamentais, grandes indústrias farmacêuticas e órgãos de saúde de diversos países para a promoção e financiamento da pesquisa em antibióticos, uma vez que muitas destas grandes empresas não veem mais lucrativas essas linhas de pesquisas e que podem levar, segundo relatório britânico, a morte de mais de 10 milhões de pessoas até 2050.^{10, 11}

Bactérias como a *Staphylococcus aureus* tem se tornado cada vez mais resistentes e sendo responsáveis por tremendas infecções hospitalares. Em vista

disso, o entendimento da permeabilidade e a interação de antibióticos nas membranas bacterianas se faz cada vez mais necessário.^{10, 11, 12, 13, 14}

Nesse contexto, a promoção de alternativas robustas e eficientes, nesta batalha contínua e desvantajosa, vem elevando a promoção de alternativas como a Inativação Fotodinâmica, IF, com a utilização de agentes FS no combate aos crescentes microrganismos resistentes.^{9, 15, 16, 17}

Dentro do escopo destes microrganismos se encontram as bactérias. Uma classificação comum e importante utilizada é apoiada nas reações de coloração de Gram e que as divide em dois grandes grupos, as Gram-positivas e as Gram-negativas.

Essas reações baseiam-se nos diferentes tipos de estrutura que compõe as paredes celulares bacterianas, como é mostrado na Figura 1. Nela, é facilmente observado em suas marcantes diferenças que as bactérias Gram-positivas possuem geralmente uma parede formada por uma única camada espessa de peptídeoglicano, um polissacarídeo composto por dois derivados de açúcares, o N-acetilglicosamina e o ácido N-acetilmurâmico, além de alguns aminoácidos.¹⁷

Já as Gram-negativas possuem ao menos duas camadas na formação da sua parede, ou envelope celular como também é conhecida. O composto peptídeoglicano de ambos os tipos é o que confere a dureza e a rigidez estrutural característica das bactérias.¹⁷

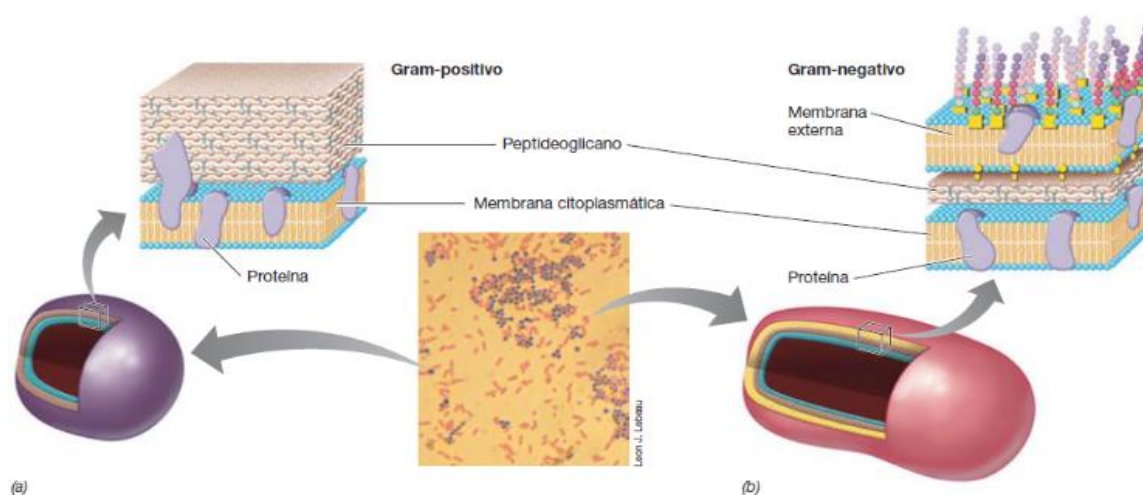


Figura 1 - Paredes celulares de bactérias: (a, b) Os diagramas esquemáticos mostram as paredes celulares das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente. A foto central apresenta células de *Staphylococcus aureus* (roxa, gram-positiva) e de *Escherichia coli* (rosa, gram-negativa).

Fonte: MADIGAN; MARTINKO; BENDER.¹⁸

Essa diferença estrutural das paredes celulares confere mecanismos diferentes de interação do FS com as bactérias Gram-positivas, que são mais susceptíveis aos FS e conseqüentemente à IF, do que a interação com o envelope celular das Gram-negativas, gerando uma barreira física que acaba por dificultar a entrada dos agentes FS, tornando-as resistentes à IF. ^{5, 19}

Diante disso, a escolha do agente FS é fundamental para o sucesso da IF. Então, nesse contexto, a curcumina um composto natural extraído das raízes da *Curcuma longa* e muito usado na culinária tem se destacada como um agente FS ao longo dos últimos anos. ¹⁷

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi o estudo das interação dos três tipos diferentes de curcuminas, a curcumina Sigma produzida pela Sigma-Aldrich®, e outras duas curcuminas produzidas pela PDT Pharma®, sendo uma que contém curcuminóides, Natural, e outra puramente sintética, designada por curcumina Sintética, com três tipos diferentes de bactérias, a *Escherichia coli*, a *Staphylococcus aureus* e a *Streptococcus mutans* em suas respectivas culturas planctônicas e em biofilmes, buscando uma melhor compreensão do comportamento da curcumina em solução, com foco no preparo para IF, comparando os resultados obtidos entre as interações dos microrganismos com as curcuminas tanto por bactérias quanto por tipo de curcumina.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Escherichia coli*

Theodor Escherich foi o primeiro a isolar de fezes infantis e relatar a existência de varas curtas e delgadas que chamou de *Bacterium coli commune* em sua publicação em 1885. Passando por vários nomes a *Escherichia coli*, *E. coli*, só foi reconhecida em 1954.²⁰ Atualmente a *E. coli* é conhecida como um comensal inofensivo do trato gastrointestinal de animais de sangue quente, sendo uma das bactérias mais estudadas e utilizadas nos laboratórios de todo o mundo, pois o fato de armazenar informações genéticas como nós, lê estas informações como nós e ainda sintetiza os mesmos tipos de ferramentas moleculares para desempenhar as funções celulares básicas.^{21, 22}

A *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa em forma de haste, da família da *Enterobacteriaceae*, que tem a capacidade de crescer tanto anaerobicamente quanto aerobicamente preferencialmente a 37° C, podendo ou não ter motilidade dependendo da existência de flagelos peritricos (Figura 2). Ela pode ser facilmente isolada de amostras fecais por possuir meios de revestimentos seletivos e a alteração do pH, devido à fermentação da lactose, pode ser utilizada para separar as cepas fermentadoras ou não de lactose.^{21, 22}

A *E. coli* por ter a capacidade de modificar o seu genoma, ganhando ou perdendo genes, ela pode se tornar altamente patogênica sendo tida como uma dos principais agentes etiológicos da diarreia moderada em crianças da África subsaariana -e do sul da Ásia.^{21, 22, 23, 24, 25}

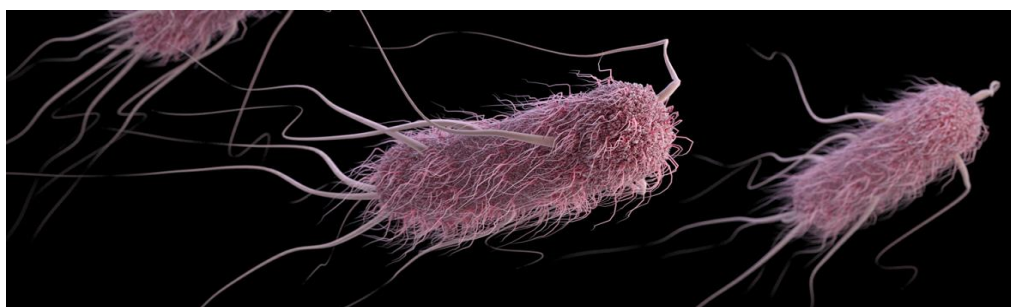


Figura 2 - *Escherichia coli*
Fonte: MADIGAN; MARTINKO; BENDER. 18

3.2 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus*, *S. aureus*, foi descrito pela primeira vez pelo médico alemão Anton Rosenbach em 1884. É uma gram-positiva sem motilidade e que cresce em cachos como uvas. Na verdade, a junção destas duas palavras que constituem seu nome *staphyle*, que do grego pode ser traduzido como “grupo de uvas”, e *coccus*, que significa “bactérias esféricas”, dizem tudo sobre a característica visual dessas bactérias já que ela são perfeitamente esféricas e possuem cerca de 1 µm de diâmetro. O seu nome *aureus*, do latim ouro, deve-se ao fato das suas colônias crescerem grandes e douradas (Figura 3).^{26, 27}



Figura 3 - *Staphylococcus aureus* – Micrografia eletrônica
Fonte: HONEYMAN; FRIEDMAN; BENDINELLI.²⁶

Não se sabe muito sobre sua origem, mas acredita-se que o *S. aureus* tenha evoluído a partir de bactérias pré-históricas do solo. Ele é do gênero *Staphylococcus* que possui cerca de 32 espécies e é um patógeno altamente adaptável estimando-se que ele colonize entre 50-60% da população.^{27, 28}

Mesmo sendo descrito a cerca de 130 anos, é quase certo de que o *S. aureus* foi matando e infectando os seres humanos por milhares de anos. Os chamados Furúnculos, que são infecções foliculares na pele comuns causados por *S. aureus*, são descritas na Bíblia. Mesmo após o naturalista holandês Antoni van Leeuwenhoek descrever pela primeira vez as bactérias em 1674, acreditando-se que provavelmente suas figuras tratassem de uma espécie de *S. aureus*, foi somente 200 anos depois que os cientistas passaram a estudar e classificar as bactérias.^{27, 28}

O *S. aureus* vive na pele e nas mucosas de animais de sangue quente, mas é nas membranas nasais, que são quentes e úmidas, que ele encontra seu hábitat ideal, estimando-se que de 10-40 % dos adultos saudáveis tenham colônias de *S. aureus* crescendo em suas narinas. Embora possa crescer em outros habitats incluindo água, materiais em decomposição e qualquer tipo de superfície, se as condições não forem favoráveis, como temperaturas entre 15 °C e 45 °C ele pode entrar em estado de latência e sobreviver por anos aguardando o melhor momento. ^{27, 29, 30, 31}

Sendo a sua parede muito espessa isso lhe confere maior resistência e uma maior pressão interna em relação à outras bactérias, sendo por estes motivos que as suas infecções são muito difíceis de tratar, pois dificultam a entrada de muitos medicamentos antibacterianos. ^{27, 29, 30, 31}

Embora o *S. aureus* cause uma grandiosa quantidade de infecções, as causadas na pele não são fatais. Infelizmente, a bactéria produz muitas lesões cutâneas superficiais tais como as infecções do folículo piloso, acne, terçol, furúnculos, doenças como orelha de nadador, infecções da orelha média, muitas infecções do trato urinário além de outras diversas causadas em diferentes partes do corpo. ^{26, 27, 29, 30}

No entanto, ele pode causar graves infecções internas, como pneumonia ou meningite, geralmente causadas após uma cirurgia ou como consequências de infecções no sangue. Com esse tipo de infecção ele também pode causar gravíssimas doenças como a artrite séptica ou infecciosa, osteomielite e endocardite. O aumento assustador desses tipos de doenças tem alarmado os grandes estudiosos devido à crescente resistência do *S. aureus* à antibióticos como as penicilinas, meticilinas, eritromicinas e clorafenicóis. ^{26, 27, 29, 30}

Em vista disso, muitos estudos no campo da IF têm ganhado espaço no combate a essa e outras bactérias devido à efetividade no tratamento e as ótimas respostas quanto bioinibição e bioestimulação. Mesmo se mostrando resistente à penetração da luz os estudos têm demonstrado uma forte inibição no crescimento do *S. aureus* após aplicação da IF. ^{6, 32, 33}

3.3 *Streptococcus mutans*

O principal causador de cáries coronais em seres humanos é o *Streptococcus mutans*, *S. mutans*, uma gram-positiva que coloniza principalmente as superfícies dos dentes se estabelecendo na boca assim que os eles estão presentes.³⁴ Eles são encontrados nas placas, transformam a glicose em ácido láctico, que é o responsável pela destruição do esmalte e consequente desmineralização do dente iniciando a cárie.^{35, 36}

Também fermentam o manitol e o sorbitol, produzindo extracelularmente glicanos de sacarose sendo cariogênicos em modelos animais.³⁷ Residem em pequenas fissuras, onde produzem dextrana, um polissacarídeo fortemente aderente que é utilizado para as suas ligações às superfícies dentárias. Como a dextrana é produzida apenas na presença de sacarose, caso ocorra a ausência dessa fonte de sacarose o altamente cariogênico *S. mutans* se tornará incapacitado de produzir a dextrana necessária à sua adesão aos dentes.^{35, 37}

Foi isolado pela primeira vez em 1924 por J. Kilian Clarke de lesões cariosas humanas e ele atribuiu o nome *mutans* devido à uma mudança na conformação visual, pois essas bactérias pareciam mais abauladas do que o normal, na coloração de Gram, e que pareciam ser uma forma mutante de *Streptococcus*.³⁸

O *S. mutans* pertence ao grupo dos *Streptococcus viridans*. Esse grupo é o responsável pela metade das bactérias encontradas na cavidade bucal, sendo amplamente encontrado na placa dental em cerca de 10^{10} bactérias por grama, podendo até atingir a corrente sanguínea e sendo um dos principais responsáveis pela endocardite, por aderir às vulvas cardíacas.³⁶

Deste modo, a pandemia de cárie dentária que acomete a população mundial tem se agravado, historicamente, devido ao aumento do consumo de carboidratos, principalmente açúcares, historicamente desde o advento da agricultura. Contudo o uso generalizado de açúcar refinado trouxe um aumento repentino da prevalência das cáries.^{39, 40}

Por esses motivos aqui descritos e outros não mencionados, como o seu pequeno genoma com cerca de 2 Mb com mais de 1900 genes, que o *S. mutans* tem chamado a atenção da comunidade científica para se tornar um grande modelo de bactéria Gram-positiva, tendo então um aumento significativo dos seus estudos ().⁴¹

Dentre as várias abordagens no tratamento *in vitro* a TFD tem se destacado com o uso de corantes naturais como a curcumina na inibição altamente destacável do número de bactérias e dos biofilmes formados pelo *S. mutans* (Figura 4).⁴²



Figura 4 - Micrografia eletrônica do *Streptococcus mutans*⁴³
Fonte: MIERCOLES⁴³

3.4 Curcumina

A curcumina é um polifenólico natural, extraído da *Curcuma longa*, que está muito presente na culinária asiática e indiana por meio do açafrão, tem sido muito estudada ao longo dos últimos anos por conta de sua gama de atividades.⁴⁴

Nos últimos tempos, o consumo de açafrão tem sido estimulado em função dos inúmeros benefícios terapêuticos atribuídos à curcumina e seus derivados.¹⁷ Alguns dos seus benefícios são os de apresentar atividades antioxidante⁴⁵, anti-inflamatória⁴⁶, antimicrobiana^{6, 33, 42, 47}, antitumoral^{9, 42, 47, 48}, nefro-protetora⁴⁹, controle da espondiloartrite durante a gravidez,⁵⁰ e ainda comprovados efeitos antiglicêmicos auxiliando no controle do diabetes^{49, 50, 51, 52, 53, 54} e com grande potencial para o tratamento do Alzheimer.⁵⁴ e de efeitos neuro-protetores no tratamento do mal de Parkinson.^{17, 42, 54}

Isolado pela primeira vez em 1842, por Vogel, a curcumina foi descrita como um pó cristalino e amarelo. Sabe-se que por ser um composto fenólico ela é insolúvel em água e éter etílico mas solúvel em etanol e em dimetilsulfóxido, conhecido por DMSO.¹⁷

A estrutura química aceita desde 1910, proposta por Lampe e Milobedeska, é de um diferoilmetano com a fórmula $C_{21}H_{20}O_6$, com peso molecular de 368,4 gramas, sendo que o composto comercial tem por padrão 77 % de curcumina, 17 % de demetoxicurcumina e 3 % de bisdemetoxicurcumina, e o restante de curcuminóides conforme a Figura 5. Juntos, estes curcuminóides tem por padrão uma cor alaranjada por absorver num comprimento de onda entre 420 a 430 nm. ^{17, 55}

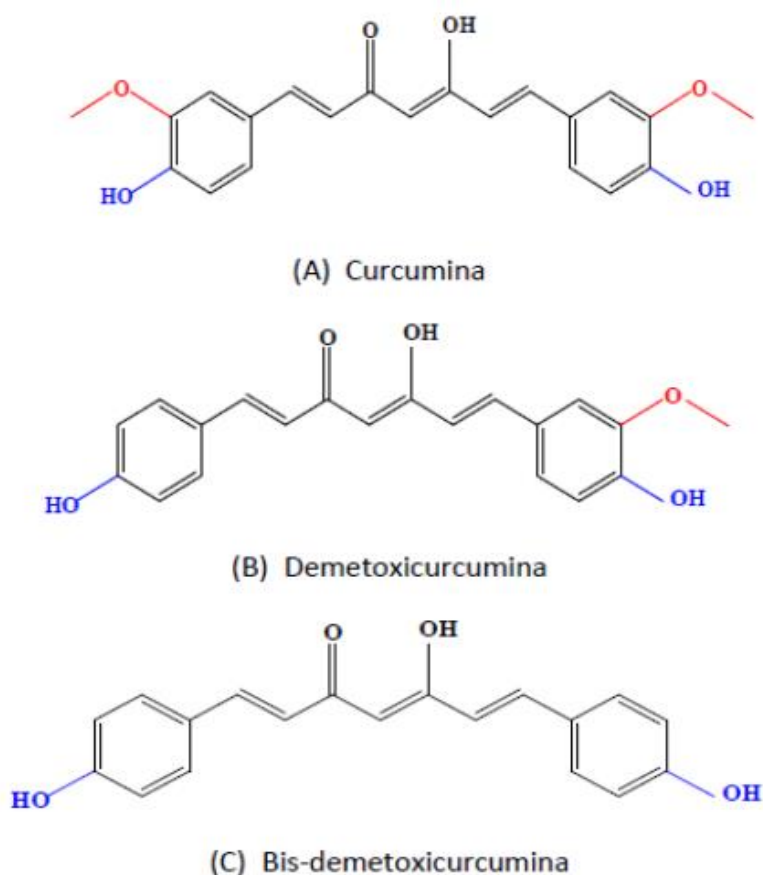


Figura 5 - Estrutura química dos elementos curcuminóides
Fonte: SILVA (13)

Do ponto de vista químico, é uma dicetona α , β -insaturada (difluoroilmetano) exibindo tautomerismo de ceto-enol (Figura 6).

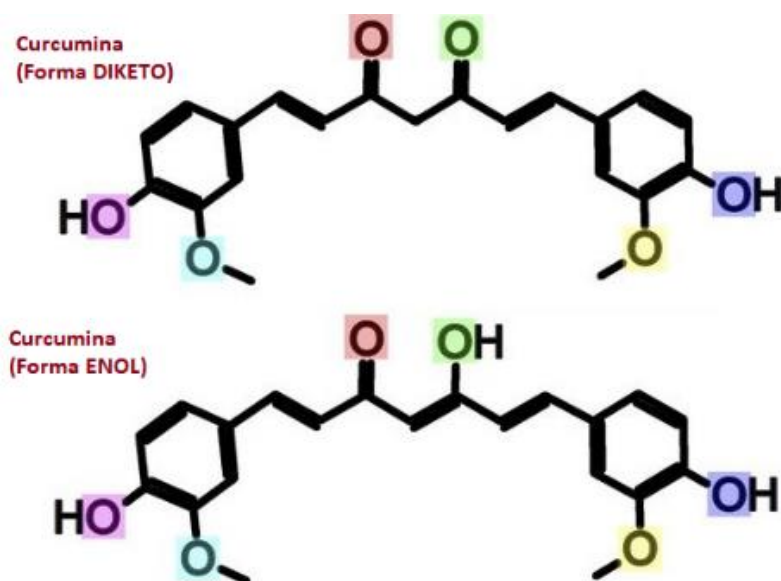


Figura 6 - As interações proteína-curcumina que são facilitadas pelos oxígenos que aceitam ligações de hidrogênio da curcumina dicetônica (em cima) e curcumina enólica (em baixo)

Fonte: HEGER et al. ⁵⁴

Devido a esses fatores altamente benéficos da curcumina, ela vem sendo estudada por diversos grupos de pesquisa aqui no Brasil como uma forte candidata de agente FS, e, com isso, ser aplicada nos tratamentos de pele, desinfecção bucal, eliminação dos mosquitos causadores da dengue e no tratamento de onicomicose. Sendo todos estes citados e trabalhados ao longo dos últimos anos pelo Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 As amostras de bactérias

Para todos experimentos foram utilizadas as cepas catalogadas de bactérias *E. coli* ATCC 25922, anexo I, *S. aureus* ATCC 25923, anexo II e *S. mutans* ATCC 25175 no anexo III. Todas foram cultivadas conforme os protocolos sugeridos em solução de crescimento bacteriano, tanto em solução líquida quanto em ágar dependendo das etapas do processo, com *BHI*, acrônimo do inglês *Brain Heart Infusion*, a 37° C e em meio aeróbico e, apenas para a bactéria *S. mutans*, foi acrescentado 1% de glicose nas soluções.

Após o crescimento das bactérias em meio, elas eram lavadas em solução tampão salina de fosfato, *PBS* acrônimo do inglês *Phosphate Buffered Saline*, por três vezes antes do início de todas as atividades, e foi garantida a condição de que o pH da solução estivesse sempre em 7,4 com erro de 0,2 para mais ou para menos.

4.2 As curcuminas utilizadas

Para a realização dos experimentos trabalhou-se com curcuminas de três diferentes procedências: a curcumina sintetizada pela empresa Sigma-Audrich de referência C1386, anexo III, que contém 84,87% de curcumina, 11,91% de demetoxicurcumina e 3,20% de bisdemetoxicurcumina e que será designada por Sigma. As curcuminas produzida e sintetizada, respectivamente, pela empresa PDT Pharma Ltda, sendo uma que contém 57,64% de curcumina, 16,5% de demetoxicurcumina e 25,99% de bisdemetoxicurcumina que será denominada ao longo deste trabalho por curcumina Natural, e a curcumina que contém 100% de curcumina em sua composição e que será designada por curcumina Sintética.

Conhecendo os pesos moleculares da curcumina, de $368,385 \frac{g}{mol}$, da demetoxicurcumina $338,385 \frac{g}{mol}$ e da bisdemetoxicurcumina $308,385 \frac{g}{mol}$ ¹⁷ foram

calculados os pesos moleculares proporcionais para cada uma das amostras utilizadas ficando assim determinados:

- Para a curcumina Sigma, $362,8183 \frac{g}{mol}$;
- Para a curcumina Natural, $348,3199 \frac{g}{mol}$;
- E, para a curcumina Sintética, $368,385 \frac{g}{mol}$;

Com isso, preparou-se as soluções estoque com todas as curcuminas de forma que se obtivesse uma concentração igual a 10 mg por ml. Para minimizar o contato das soluções com a luz, todos os tubos, do tipo Falcon de 50 ml, utilizados foram recobertos por papel alumínio e as soluções foram manipuladas sem a presença da luz direta em todos os experimentos. Também foi garantido o pH 7,4 das soluções à 27°C. fazendo as medidas no equipamento Mili-Q da Milipore do modelo Integral 10 trabalhando a 18,2 Ω de resistividade.

4.3 Equipamento

O equipamento utilizado para as medidas de absorbância foi o espectrofotômetro Cary UV-Vis 50, Varian (Figura 7).



Figura 7 - Cary UV-Vis 50 – Varian.
Fonte: Elaborada pelo autor

4.4 Software

Para a análise de todos os dados provenientes do espectrofotômetro assim como a produção de todos os gráficos foi utilizado o software *Origin®* da *Origin Lab Corporation* licenciado pela Universidade de São Paulo.^{56, 57}

4.5 Descrição dos experimentos

Basicamente foram feitos cinco tipos de experimentos. Um que acompanhou o crescimento das bactérias ao longo do tempo, outro que buscou caracterizar a centrifugação, outro que objetivou caracterizar os diferentes tipos de curcuminas em etanol e em diferentes concentrações, outro em que se promoveu diluições fracionadas das bactérias e, por fim, um que uniu em cada uma das diluições fracionadas das bactérias com os diferentes tipos de curcuminas buscando, dessa forma, a concentração ideal da respectiva curcumina na interação com a respectiva bactéria.

Vale ressaltar que os dois últimos experimentos foram feitos simultaneamente para cada conjunto de bactérias alternando apenas os diferentes tipos de curcuminas, e foram ratificados que todos os experimentos fossem reproduzidos em triplicatas biológicas para que as médias dos resultados fossem estatisticamente garantidas.

4.5.1 Experimento: Caracterização das curcuminas em etanol

Foram preparadas para o experimento três soluções de etanol com cada um dos três tipos de curcuminas em concentrações de 10 e 20 $\frac{mg}{ml}$ para as curcuminas Sigma e Natural e de 10, 20 e 50 $\frac{mg}{ml}$ para a curcumina Sintética e mediu-se a absorvância no espectrofotômetro.

4.5.2 Experimento: Crescimento das bactérias

O experimento consistiu em fazer um pré-inóculo, de 60 ml para *E. coli* e *S. aureus* e de 140 ml para *S. mutans*, com cada uma das bactérias e distribuí-las em diferentes tubos, com 10 ml para *E. coli* e *S. aureus* e de 5 ml para *S. mutans*, e coloca-las na estufa a 37 °C +/- 2 °C e durante determinados momentos eram retiradas alíquotas de 2 ml para leitura no espectrofotômetro e em seguida fazia-se o plaqueamento em triplicatas.

4.5.3 Experimento: Caracterização da centrifugação

Neste experimento utilizou-se apenas 10 ml das bactérias *E. coli* e *S. aureus*, em *PBS*, e em duas concentrações diferentes cada uma. Sendo uma em torno de 10^9 bactérias por mililitro de suspensão e outra, sua metade, em torno de 5×10^8 bactérias por mililitro de suspensão. As quatro soluções foram colocadas na centrífuga durante 10 minutos para cada uma das rotações que variaram de 200 em 200 rpm iniciando-se em 800 rpm e finalizando em 3000 rpm (1409 g). Em cada término do ciclo de tempo de 10 minutos foi retirada uma alíquota de 2 ml do sobrenadante para leitura no espectrofotômetro.

4.5.4 Diluição do caldo bacteriano lavado e interação com curcumina

Para este experimento fez-se um pré-inóculo de 10 ml com cada uma das bactérias e deixou-as para crescerem na estufa de um dia para o outro. Logo após elas foram retiradas e lavadas por três vezes em *PBS*, utilizando-se a rotação de 3000 rpm (1409 g) por 10 minutos ao longo de todo o processo de lavagem.

Em seguida foi ajustado, acrescentando-se *PBS* ao meio, a concentração das soluções bacterianas de modo que a absorbância ficasse em torno de 2 para cada uma delas. Então, foram retirados 12 ml dessa solução e colocados em um novo tubo e iniciou-se o processo das diluições sequenciais, do tipo S.

Primeiramente retirou-se 6 ml do tubo e os distribuiu em 4 microtubos, do tipo *ependorf*, de 1,5 ml cada um. Em seguida adicionou-se outros 6 ml de *PBS* ao tubo

de forma que o primeiro tubo retornasse a ficar com os 12 ml iniciais. Repetiu-se este processo por sete vezes de forma que foram obtidos trinta e dois microtubos, sendo quatro a quatro com as mesmas diluições. Estas diluições foram chamadas de diluições S e variaram de S_0 , suspensão bacteriana lavada obtida do caldo crescido, até S_7 , suspensão bacteriana obtida após a sequência de diluições.

Como solução de armazenamento, do inglês *stock solution*, utilizou-se das soluções de curcuminas anteriormente preparadas na concentração de $10 \frac{mg}{ml}$ para cada uma das curcuminas.

Então, com o ambiente escuro tendo-se como solução de trabalho, do inglês *work solution*, uma alíquota de $3 \mu l$, adicionou-se e agitou-se em cada uma das diluições S. Esta quantidade de curcumina foi escolhida de forma que a concentração final de curcumina no microtubo fosse em torno de $50 \mu Molar$. Aguardou-se no escuro um tempo de 5 minutos para que ocorresse a interação curcumina-bactéria e em seguida centrifugou-se por 10 minutos a 3000 rpm (1409 g).

Em seguida, foram retiradas de cada micro tubo *ependorf*, do mais diluído S_7 para o mais concentrado S_0 , cuidadosamente, de modo a não perturbar o *pellet* formado ou não ocasionar uma eventual turbidez do fundo do tubo, alíquotas de aproximadamente 1 ml do sobrenadante para que fossem realizadas as medidas no espectrofotômetro.

Por fim, após a realização das medidas de absorbância fez-se os respectivos plaqueamentos para as contagens de unidades formadoras de colônias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Buscando uma melhor organização na apresentação do trabalho, o capítulo de Resultados e Discussões será composto por três grandes blocos:

- 1- Sobre a caracterização óptica de curcuminas obtidas de três procedências distintas em um bom solvente, o etanol, e um solvente aquoso, o *PBS*, propício para se estabelecer cultura viável de bactérias;
- 2- Sobre a utilização de metodologias ópticas que podem ser aplicadas na quantificação e caracterização de bactérias;
- 3- Sobre a interação das curcuminas com a parede celular e a posterior internalização das mesmas nas respectivas bactérias.

5.1 Caracterização óptica das curcuminas

A curcumina é pouco solúvel em água com pH neutro devido à forte hidrofobicidade da cadeia conjugada, e a indisponibilidade de um grupo polar forte torna a molécula insolúvel ou moderadamente solúvel em solventes polares. Mesmo assim, estas moléculas têm sido usadas com sucesso em ambiente aquoso pelas suas potencialidades terapêuticas ⁶, porém os efeitos da solubilidade e estabilidade estrutural em água ainda permanecem controversos ou pouco entendidos.⁵⁸

Na presente seção, a estabilidade estrutural da curcumina em solução aquosa é investigada em detalhes e o processo de formação de agregados moleculares é estudado através da realização de medidas detalhadas espectroscópicas UV-Vis, incluindo os efeitos de espalhamento óptico. A curcumina solúvel em etanol será usada como um sistema molecular de referência que se encontra totalmente solubilizado.

Para a realização de todos os experimentos deste estudo, trabalhou-se com três curcuminas de diferentes procedências.

A curcumina da empresa Sigma-Audrich de referência C1386, Anexo 1, composta por 84,87% de curcumina, 11,91% de demetoxicurcumina e 3,20% de bisdemetoxicurcumina que será designada por **Sigma** e destacada na cor vermelha,

sendo que em todos os gráficos em que esta curcumina apareça seus pontos estarão também em vermelho.

Para as curcuminas da empresa PDT Pharma Ltda, a curcumina contendo em sua composição 57,64% de curcumina, 16,5% de demetoxicurcumina e 25,99% de bisdemetoxicurcumina, que será denominada por **Natural** e apresentará a cor laranja nos gráficos em todos os pontos em que apareça.

A outra curcumina sintetizada que contém 100% de curcumina e que será designada ao longo deste trabalho por curcumina **Sintética** na cor azul-petróleo nos gráficos e pontos em que aparecer.

5.1.1 Curcuminas em etanol

Para a obtenção de um conhecimento mais detalhado e profundo para a padronização das três curcuminas e uma possível comparação entre suas propriedades, foram realizadas previamente medidas de caracterização óptica das mesmas em diferentes concentrações.

A espectroscopia por absorvância pode dar informação quanto à degradação, estabilidade estrutural (tautomerismo) e a formação de agregados. Etanol é um bom solvente para a curcumina^{59, 60} e esta solução será utilizada como referência neste trabalho.

O Gráfico 1(a) mostra um espectro típico de absorvância da curcumina Sigma, linha vermelha, em uma solução de etanol na concentração de $10 \frac{\mu g}{ml}$, isto é, $27 \mu M$ (esta solução preparada foi deixada como solução de trabalho para os futuros experimentos).

Utilizou-se a escala log no eixo das absorvâncias para melhor visualizar o espectro para pequenas intensidades. A banda larga em baixas energias com coeficiente de extinção máximo em 429 nm é associada a transições ópticas $\pi - \pi^*$ entre estados π -conjugados. A absorvância de 1,48, em linha contínua preta, corresponde ao valor de coeficiente de extinção molar ϵ de $5,2 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$ em etanol⁶¹ para a concentração de $27 \mu M$ e que coincide com valor máximo da banda em 429 nm. Este resultado indica que a curcumina Sigma em etanol possui propriedades

ópticas padrões de um sistema molecular estável. A transição em 262 nm tem sido associada a transições $n-\pi^*$ devido à excitação de um elétron de pares isolados de oxigênio para orbitais π -antiligante do grupo carbonila na curcumina.⁶²

Pode-se ver que o limite de detecção do espectrômetro é dado pelo sinal da linha de base acima de 600 nm para a solução de curcumina em etanol. Esse limite mínimo de detecção é para valores de absorvância em torno de 10^{-3} . Esse limite é de 4×10^{-4} para o espectrômetro utilizado.

Se for considerado o efeito de espalhamento molecular que dependem de λ^{-4} elevam a linha de base para os níveis de 10^{-3} , a curva que representa essa contribuição na absorvância da curcumina é dada pela curva tracejada preta. O espectro de cor cinza é a absorvância da curcumina corrigida do efeito deste espalhamento específico, o que leva a linha de base aos valores de limite de detecção dado pelo aparelho.

Pode-se ver que o espalhamento Rayleigh pouco afeta a absorvância da curcumina para a concentração utilizada. O ajuste da banda $\pi-\pi^*$ leva a contribuição de duas bandas: uma em azul e outra em laranja com máximos em 365 nm e 434 nm, respectivamente. A banda menos conjugada em 365 nm pode estar associada à forma keto e a mais conjugada em 434 nm à forma enol devido à tautomerização keto-enol.^{48, 63}

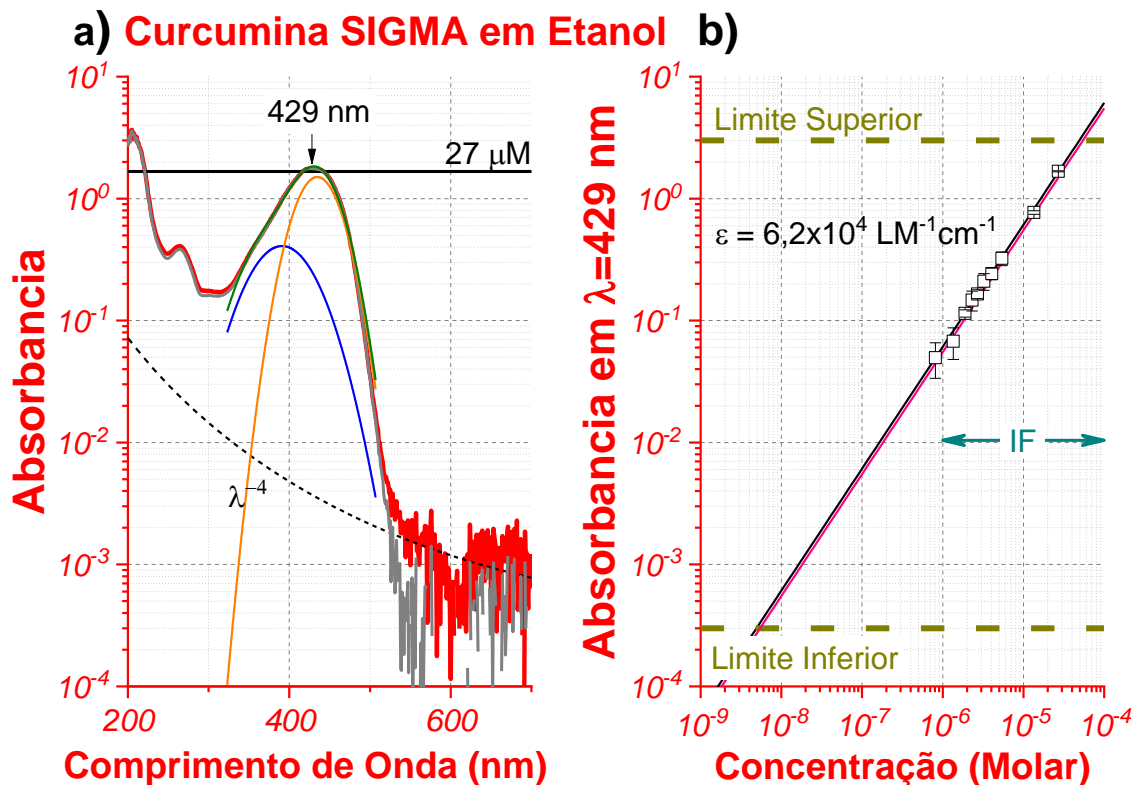


Gráfico 1 - a) Espectro de Absorbância na região espectral UV-Vis para a curcumina Sigma em etanol na concentração de $27\mu\text{M}$. b) Absorbância da curcumina Sigma medida em 429 nm para a faixa de concentrações molares típicas utilizadas em IF. A concentração molar foi estendida para a região de 1 nM a $100\mu\text{M}$ para evidenciar os limites superior e inferior do espectrômetro utilizado no presente trabalho. A linha vermelha corresponde ao ajuste da Lei de Beer-Lambert e a linha preta corresponde ao valor do coeficiente de extinção medido na referência. O ajuste da banda $\pi\text{-}\pi^*$ leva a contribuição de duas bandas: uma em azul e outra em laranja com máximos em 365 nm e 434 nm , respectivamente.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O Gráfico 1(b) mostra a dependência da absorbância da curcumina avaliada em 429 nm em função de sua concentração molar em etanol que varia na faixa de doses típicas de fármacos acima de $1\mu\text{M}$ que são utilizadas em experimentos de IF.

Esta dependência deve seguir a lei de Beer-Lambert se a espécie molecular se encontra na forma monomérica ou livre. O Gráfico 1(b) apresenta os dados, pontos quadrados, em escala log-log estendida, o que não afeta a dependência linear esperada, mas mostra os limites de detecção do espectrômetro.

O limite superior não deve ultrapassar valores de absorbância maiores que $3\left(\frac{I_0}{I} = 10^3\right)$, uma vez que saturação da absorbância começa para valores maiores que 1. A reta contínua preta é o ajuste dos pontos experimentais que fornece um coeficiente de extinção molar de $6,2 \times 10^4\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para a curcumina Sigma em etanol.

A reta contínua vermelha é obtida utilizando $\varepsilon = 5,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ dado pela literatura.⁶² É interessante notar que o equipamento nos permite caracterizar a curcumina na faixa de concentrações molares variando acima de 3 ordens de grandeza entre 5 nM e 30 μM .

Sendo o etanol um bom solvente para a curcumina, pode-se inferir do Gráfico 1-a que ela apresenta as propriedades da curcumina livre através de seu pico de absorvância em 429 nm.

Estando livre, a molécula da curcumina apresenta a característica de uma molécula conjugada, em que ao longo de sua cadeia carbônica há alternância de ligações simples e duplas.

Dentre as ligações duplas temos as ligações do tipo σ que são ligações mais fortes e estão no plano espacial da molécula e as ligações do tipo que estão perpendiculares ao plano molecular.

Estas ligações do tipo π , são mais fracas do que as ligações do tipo σ e por conta dessa posição espacial apresentam uma maior mobilidade para seus elétrons e que ao serem irradiados estabelecem ligações $\pi-\pi^*$ característicos de ligações conjugadas e picos e como o de 429 nm.^{64, 65}

5.1.2 Estabilidade da curcumina em meio aquoso

A fotoinibição exige interação do fotossensibilizador com as paredes celulares de microrganismos como bactérias e leveduras e a posterior internalização do mesmo no meio intracelular. Potenciais aplicações terapêuticas da curcumina exigem entendimento da solubilidade em água, uma vez que sua estabilidade e solubilidade em água permanecem pouco compreendidas.^{66, 67, 68}

Esta seção trata da estabilidade da curcumina em meio aquoso a pH neutro e temperatura ambiente de 27°C. Apesar da sua baixa solubilidade em água, existem condições que aumentam sua biodisponibilidade para uso em IF.⁶⁸

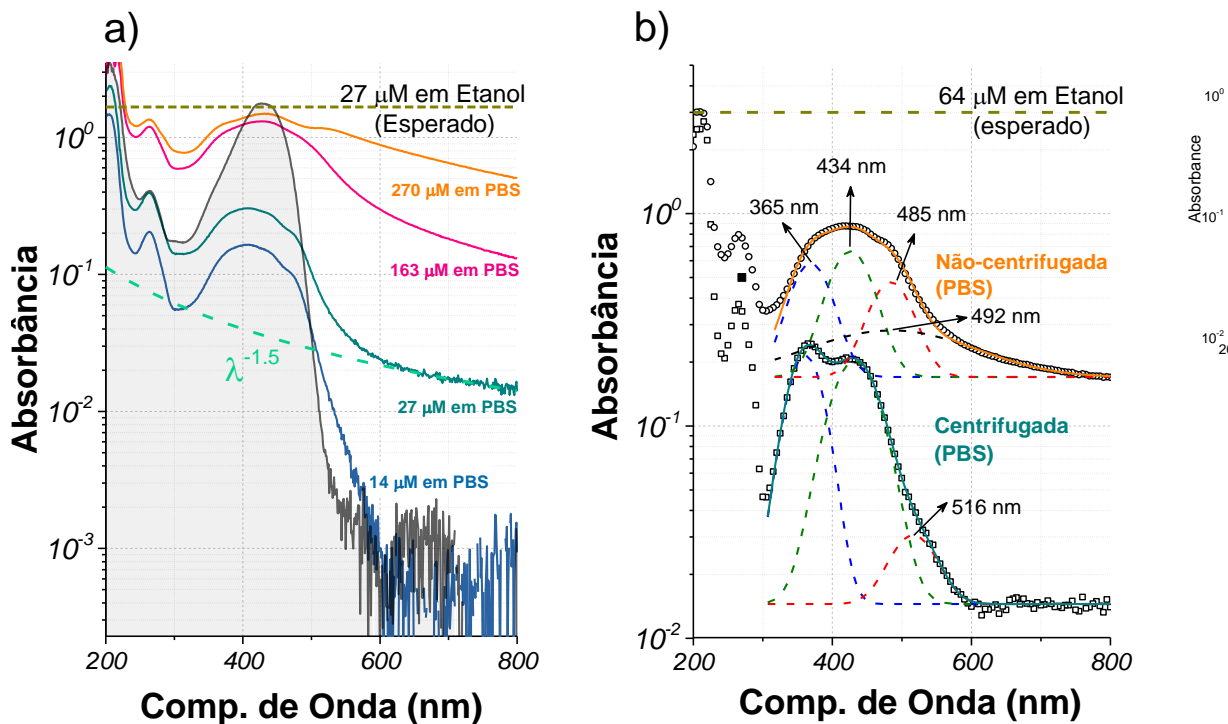


Gráfico 2 - a) Espectro de Absorbância na região espectral UV-Vis para a curcumina Sigma em etanol nas concentrações de 14 μM , 27 μM , 163 μM e de 270 μM . Neste gráfico fica visível que conforme há o aumento da concentração também ocorre o aumento das linhas de absorção e também uma mudança na forma da linha, entre 600 e 800 nm, gerada devido ao espalhamento associado provavelmente à formação de partículas moleculares aglomeradas. b) Curvas normalizadas da absorvância da curcumina Sigma medida na região espectral UV-Vis na concentração molar de 64 μM . A curva superior mostra pelo espalhamento observado na região entre 600 e 800 nm a formação de partículas aglomeradas, hipótese esta confirmada e observada na curva inferior gerada após a centrifugação, a 15.000 rpm por 15 min, pelo desaparecimento do espalhamento na região entre 600 e 800 nm.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O Gráfico 2(a) compara as absorvâncias da curcumina Sigma em etanol na concentração de 27 μM , que é o espectro hachurado em cinza tido como referência, e em soluções aquosas em pH neutro para concentrações molares variando na faixa de 14 μM a 279 μM .

Estas soluções foram preparadas e medidas após um prazo de 3 horas. O logaritmo da absorvância mostra a evolução dos espectros da curcumina em água em função da concentração molar. Primeiramente, é nítido o deslocamento vertical da linha de base dos espectros com o aumento da concentração causado pelas perdas devido a efeitos de espalhamento que serão discutidos com mais detalhes a seguir.

O aumento da concentração de curcumina produz também um alargamento da banda $\pi-\pi^*$ para regiões espectrais comprimento de onda maior que 500 nm . Estes dois efeitos são causados pela formação de agregados moleculares que geram estados moleculares de menor energia, como os agregados J, e cristais moleculares, particulados, que produzem o espalhamento da luz.^{69, 70, 71, 72}

É interessante observar que a solução contendo concentração de curcumina igual a $14\ \mu\text{M}$, Gráfico 2(a), possui um alargamento espectral a baixas energias devido à formação de agregados moleculares, porém a linha de base coincide com aquela medida para a curcumina em etanol, ou seja, não há formação de particulados nessa concentração.

Nesse caso, o valor do máximo de absorvância da banda conjugada $\pi-\pi^*$ devido à curcumina livre é de 0,16 ou equivalente à concentração de aproximadamente $2,9\ \mu\text{M}$ de curcumina livre em solução, o que é aproximadamente 5 vezes menor do que o valor esperado de 0,75. Nesse caso, 78 % da massa de curcumina em solução forma agregados moleculares enquanto 22% ainda se encontra na forma molecular livre.

Já a solução contendo concentração de curcumina duas vezes maior, $27\ \mu\text{M}$, apresenta a linha de base deslocada devido a perdas de intensidade de luz por espalhamento em particulados proporcional a $\lambda^{-1,5}$. Considerando a subtração do efeito desse espalhamento, a intensidade de absorvância da banda conjugada $\pi-\pi^*$ é de 0,26, 5,5 vezes menor que o valor esperado, o que equivale uma concentração de $4,7\ \mu\text{M}$ de curcumina livre em solução aquosa.

Assim, a curcumina em solução aquosa na concentração de $27\ \mu\text{M}$ possui 9% da massa na forma molecular livre e 91% na forma de agregados moleculares e particulados.

Veremos que novas bandas aparecem na região espectral de baixa energia, comprimentos de onda acima de 500 nm , devido a agregados para concentrações maiores que $27\ \mu\text{M}$, o que dificulta a quantificação detalhada realizada acima através das medidas de absorvância.

Porém, agregados moleculares grandes e particulados podem ser removidos por centrifugação. O Gráfico 2(b), compara o espectro de absorvância da curcumina

em solução aquosa na concentração de $64 \mu M$ com o espectro da mesma solução após centrifugação de 15000 rpm , 17 g , por 10 min .

As transições ópticas entre estados conjugados π e π^* da amostra não centrifugada foram ajustadas pelas bandas originais oriundas de moléculas livres em 365 nm , linha pontilhada em azul no Gráfico 2(b), e 434 nm , linha pontilhada em verde no Gráfico 2(b), com mesma posições espectrais da amostra de referência no Gráfico 2(a), e por mais duas bandas posicionadas em 485 nm , linha pontilhada em vermelho, Gráfico 2(b), e 494 nm , linha pontilhada em preto no Gráfico 2(b).

As perdas por espalhamento foram ajustadas por um comportamento do tipo $\lambda^{-1.5}$, não mostrada. O ajuste, linha contínua em laranja Gráfico 2(b), coincide com os pontos do espectro medido de absorbância em toda a faixa espectral ajustada com a inclusão das duas bandas novas em baixa energia com origem em agregados moleculares.

Os efeitos da centrifugação no espectro de absorbância da amostra de concentração de $64 \mu M$ descrita no parágrafo acima, Gráfico 2(b), são a redução da linha de base de uma ordem de grandeza devido ao espalhamento por particulados e a redução drástica das novas bandas em baixa energia.

A forma de linha de absorbância pode ser ajustada pelas bandas associadas a moléculas livres em 365 nm , linha pontilhada em azul, e 434 nm , linha pontilhada em verde, e por uma pequena contribuição em baixa energia devido a agregados moleculares em 516 nm , linha pontilhada em vermelho.

É interessante notar que as bandas associadas à curcumina livre estão mais resolvidas e que existe uma inversão de intensidades das contribuições associadas ao tautômero enol em 434 nm e ao keto em 365 nm quando comparamos com as duas contribuições da amostra não centrifugada.

O valor da absorbância da componente em 365 nm em relação à linha de base é $0,21$, o que equivale a uma concentração de $3,8 \mu M$. Essa concentração corresponde a $1,4 \mu g$ de curcumina livre, ou 7% da massa total em solução.

A estabilidade da curcumina quanto à formação de agregados moleculares e particulados pode ser vista através evolução temporal dos espectros de absorbância na região entre 200 nm a 800 nm para curcumina Natural, Gráfico 3(a), e Sigma Gráfico 3-b, em solução aquosa na concentração de $27 \mu M$.

Nesse experimento, espectros de absorvância foram medidos a cada 5 min em um tempo total foi de 4h. O Gráfico 3 exibe apenas alguns espectros de modo a mostrar a evolução temporal e facilitar a visualização. Os espectros da amostra de referência em etanol na concentração de $27 \mu M$, espectro pontilhado em preto, estão presentes para comparação, bem como os limites de absorvância esperados para o máximo da banda conjugada de 1,48, nessa concentração e para a detecção do equipamento de 4×10^{-4} .

Já o Gráfico 2(b) em que são apresentadas as curvas de absorvância normalizadas da curcumina, na concentração de $64 \mu M$, em que há uma comparação da curva centrifugada e da curva não centrifugada observa-se claramente redução significativa do espalhamento na região entre 600 nm a 800 nm . Esta característica evidencia a formação de partículas aglomeradas de curcumina, característica dessa região espectral.^{64, 65}

A curcumina natural é muito estável em água, Gráfico 3(a). O espectro de absorvância varia pouco com o tempo, porém a intensidade da banda conjugada para tempo zero é de 0,57, ou seja, 38% do valor esperado para a curcumina em etanol.

Nesse caso, a massa de curcumina livre em solução é de $3,6 \mu g$ e os restantes $6,4 \mu g$ formam agregados moleculares que são observados pelo alargamento à baixa energia.

A absorvância varia muito pouco e o alargamento devido a agregados moleculares pouco varia até 4 horas de experimento. O comportamento da linha de base pode ser ajustado pela dependência do tipo λ^{-n} , portanto, sem a presença de espalhamento por particulados, $\lambda^{-n}, 1 < n < 4$.

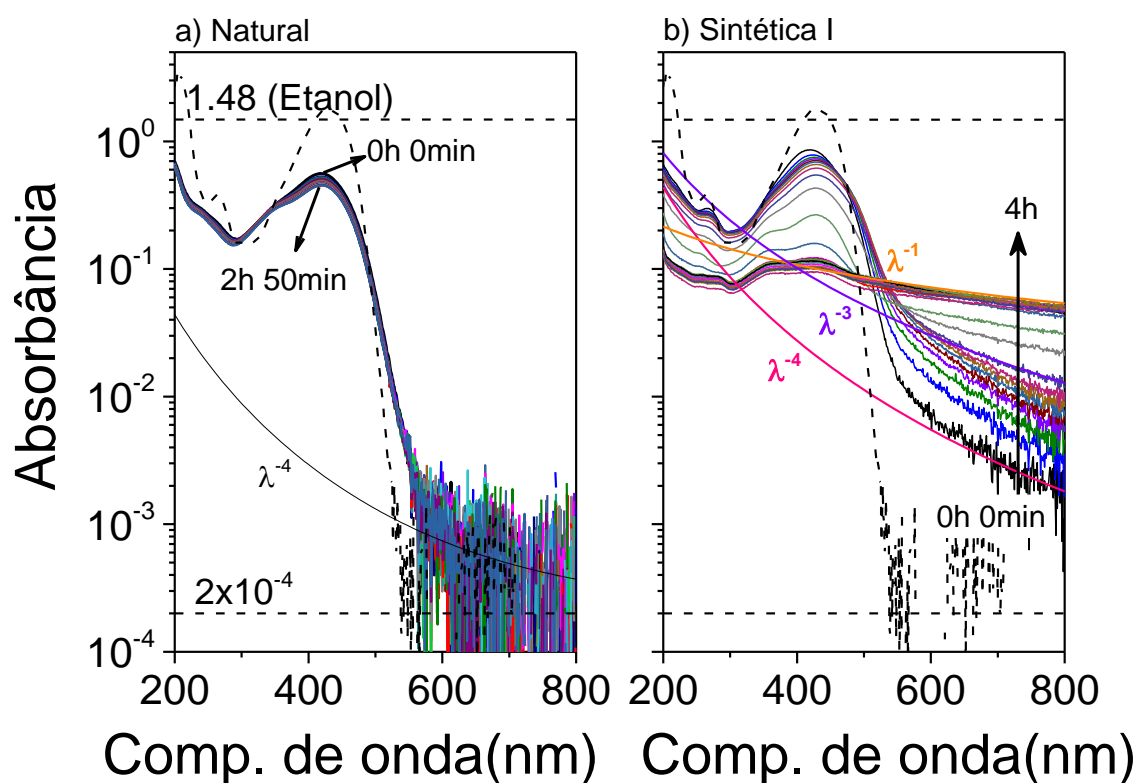


Gráfico 3 - a) Espectro de Absorbância na região espectral UV-Vis para a curcumina Natural em etanol na concentração de $27\mu\text{M}$ ao longo de 2 h e 50 min, deixando evidente que o padrão da curva não se altera e de que não há a formação de aglomerados de partículas moleculares. b) Espectro de Absorbância na região espectral UV-Vis para a curcumina Sigma em etanol na concentração de $27\mu\text{M}$ ao longo de 2 h e 50 min deixando evidente a formação de aglomerados de partículas moleculares que é observado na significativa modificação das curvas de absorbância em que saem de partículas livres inicialmente e vão para partículas aglomeradas após as 2 h e 50 min.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Já as curcuminas Sintética e Sigma apresentam instabilidade temporais no intervalo de 3 horas de observação, Gráfico 3-b apenas da curcumina Sintética. O espectro de absorbância para tempo zero, em linha preta, apresenta intensidade da banda conjugada de 0,84, ou seja, 57% do valor esperado para a curcumina em etanol.

Esse valor inicial corresponde a uma massa de curcumina livre em solução aquosa de $5,7 \mu\text{g}$, maior que o da curcumina Natural. No entanto, a presença de agregados moleculares maiores eleva a contribuição do espalhamento molecular, mas que ainda apresenta comportamento do tipo λ^{-4} .

A medida que o tempo aumenta a intensidade da fração de curcumina livre, para $\lambda < 500 \text{ nm}$, ao mesmo tempo que a contribuição de luz espalhada aumenta, para $\lambda > 500 \text{ nm}$. Este comportamento gera um ponto isobéstico que pouco varia em

torno de 550 nm. Um ajuste do comportamento do espalhamento foi realizado para $\lambda > 500$ nm e extrapolado para toda a região espectral analisada.

É interessante notar que a contribuição do espalhamento por particulados varia de tal forma que o comportamento λ^{-n} , $1 < n < 4$, pode ser observado para diferentes tempos durante o período de 4 horas.

O expoente n permanece constante em 4 durante os primeiros 70 min indicando espalhamento tipo Rayleigh por moléculas livres e agregados moleculares de dimensão menor que 70 nm, $\frac{\lambda}{10}$. O Gráfico 3-b mostra ainda que a intensidade desse espalhamento aumenta para $\lambda > 500$ nm, o que está associado ao aumento da concentração de agregados moleculares, fase de nucleação primária envolvendo agregados, e/ou aumento da sua seção de choque.

O valor de n passa de 4 para 1 rapidamente no intervalo de 25 min acima do tempo de 70 min, nucleação secundária envolvendo particulados maiores, e depois permanece igual a 1 durante os 120 min restantes do experimento.

Esta variação decrescente do expoente n está associada ao aumento do tamanho dos particulados.

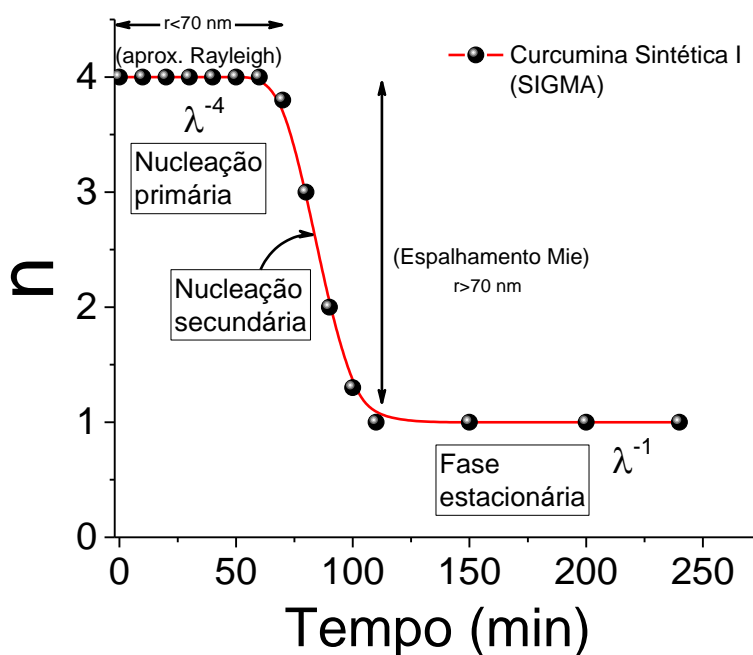


Gráfico 4 - Curva temporal de nucleação da curcumina Sigma em PPS, com a evolução do tempo observa-se uma transição do espalhamento Rayleigh para o espalhamento Mie.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A evolução temporal da estabilidade da curcumina, em $10 \mu M$, mostrada acima nos Gráfico 3(a) e Gráfico 3(b) podem ser mais bem analisada através da Gráfico 4.

Os Gráfico 5 (a)-(c) comparam a variação temporal do valor da absorbância (mostrado em escala log) avaliado para 4 comprimentos de onda para a curcumina Natural, Sintética I (Sigma) e Sintética II (PDT Pharma), respectivamente.

A absorbância foi monitorada nos comprimentos de onda de 355 nm (molécula livre na forma keto, quadrados pretos), 420 nm (molécula livre na forma enol, círculos vermelhos), 500 nm (agregados moleculares, triângulos verdes) e de 700 nm (particulados, triângulos azuis), durante o tempo de estabilização das soluções de curcumina.

Pode-se observar uma grande estabilidade da curcumina Natural (Gráfico 5 (a)). Fora a formação quase instantânea de estados moleculares agregados observado pela perda de massa de 64% de curcumina livre em água descrita acima, a curcumina se mantém estável quanto a formação de agregados particulados.

Isso pode ser visto pelo fato do valor da absorbância permanecer dentro dos níveis de detecção em 4×10^{-4} (linha azul) e pela pouca variação da absorbância para os outros comprimentos de onda monitorados.

Esta estabilidade temporal da curcumina natural não é observada para as curcuminas Sintética I (Gráfico 5 (b)) e Sintética II (Gráfico 5 (c)). Pode-se observar que a absorbância envolvendo estados conjugados da curcumina livre em 355 nm e 420 nm diminui continuamente nos primeiros 130 min e depois se estabiliza nos 110 min restantes para as duas curcuminas sintéticas.

Pode-se notar que a componente enol mais conjugada da absorbância em 420 nm cai mais rapidamente do que a componente keto em 355 nm, o gera a inversão de intensidade observada acima. Já a região da formação de agregados moleculares sondado em 500 nm aumenta e depois diminui nos primeiros 90 min e se estabiliza até o final do experimento.

Na região do espalhamento por particulados, a absorbância aumenta continuamente até 130 min e se estabiliza para tempos maiores. A escala monolog expandida até os limites de detecção do equipamento mostra a evolução, mas não mostra o comportamento da estabilidade de forma fidedigna.

Como o espalhamento aumenta, deve-se subtrair esse efeito na variação negativa da absorvância envolvendo estados de molécula livre e agregada. Isso será tratado com mais detalhe abaixo.

As Gráfico 5(d)-(f) mostram a mesma variação temporal do valor da absorvância (mostrada agora em escala linear) das Gráfico 5(a)-(c), fazendo agora a comparação entre as diferentes curcuminas Natural (quadrados pretos), Sintética I (Sigma, triângulos azuis) e Sintética II (PDT Pharma, triângulos verdes) para os comprimentos de onda 420 nm (molécula livre na forma enol), 500 nm (agregados moleculares) e de 700 nm (particulados).

Primeiramente, pode-se ver que os pontos próximos ao tempo zero possuem absorvância maior para a molécula livre em 420 nm e que representam a etapa final do processo rápido de perda de massa de moléculas livres (pontos azuis para as curcuminas Sintéticas I, Sigma, e verde para a sintética II, PDT Pharma) para agregados moleculares nos primeiros minutos de preparação das amostras.

Esse comportamento não mostrado nas Gráfico 5(d)-(f) é denominado de processo zero no presente trabalho. A formação de agregados moleculares pequenos nessa fase 0 não computada é demonstrada pelo forte aumento da absorvância associada a estados agregados em 500 nm logo nos primeiros minutos de medida para as curcuminas sintéticas.

Desconsiderando o processo zero inicial em que ocorre uma rápida de perda de massa de curcumina livre da solução para agregados moleculares, a Gráfico 5 (d) permite inferir a porcentagem da massa de curcumina livre no tempo inicial de monitoramento $t=0$ min em relação a massa nominal utilizada na preparação da solução de $10 \mu\text{M}$ ($10 \mu\text{g}$ em 1 ml): a curcumina Sintética I começa com a maior da massa inicial em torno de 56%, a Sintética II com 44%, enquanto que a Natural possui 35% de sua massa inicial para $t=0$ min.

Após esta grande perda inicial, a massa da curcumina Natural se estabiliza nesse valor do mesmo modo que a contribuição dos agregados moleculares monitorado em $\lambda=500$ nm (Gráfico 5 (e), quadrado preto) e, como vimos acima, não há formação de particulados (Figura Gráfico 5(e)), quadrado preto).

As Gráfico 5(d)-(f) mostram de forma clara outros regimes de variação temporal da absorvância para as curcuminas sintéticas para $t>0$ min. No primeiro regime (regime 1), as absorvâncias em 420 nm associada a moléculas livres diminuem

linearmente (Gráfico 5 (d)) a uma taxa de aproximadamente $0,016 \mu\text{g}/\text{min}$ no intervalo entre 0-75 min para a curcumina Sintética I e entre 0-40 min para a Sintética II.

Ao mesmo tempo, a fração de agregados moleculares aumenta rapidamente, atinge um máximo e cai continuamente dentro do regime 1 para as duas curcuminas sintéticas (Gráfico 5 (e)).

Já a formação de particulados monitorado em 700 nm aumenta linearmente (Gráfico 5 (f)) nesse primeiro intervalo de tempo (regime 1). Esses resultados mostram que agregados moleculares estão sendo gerados e os mesmos formam particulados que produzem. O aumento do espalhamento na casa de 10^{-2} é pequeno para influenciar as variações na absorbância das moléculas livres e agregados moleculares no regime 1.

Após o primeiro regime, a massa de curcumina livre cai rapidamente (Gráfico 5 (d)) a uma taxa de $0,15 \mu\text{g}/\text{min}$ intervalo de tempo entre 75-125 min para a curcumina Sintéticas I, Sigma, (pontos azuis) e entre 40-125 min para a sintética II, PDTPHARMA (pontos verdes).

Nesse segundo regime, agregados moleculares diminuem ainda mais formando particulados maiores (Gráfico 5 (e)) e se estabiliza após 80 min de dependência temporal. A queda rápida da fração de molécula livre também contribui para o aumento expressivo significativo da concentração de agregados particulados no regime 2 (Gráfico 5 (f)) para as duas curcuminas sintéticas até o tempo de 125 min.

Após esse regime, as variações da absorbância terminam indicando uma estabilidade da solução (regime 3). Descontando a contribuição do espalhamento nesse regime, a massa de curcumina livre que permanece em solução é de $0,055 \mu\text{g}$ ($\sim 0,6\%$ da massa nominal) para a Sintética I e $0,035 \mu\text{g}$ (ou $\sim 0,4\%$ da massa nominal) para a Sintética 2. Já a massa final da curcumina Natural é de $2,6 \mu\text{g}$ ($\sim 1/4$ da massa inicial).

Os outros $3/4$ da massa inicial de curcumina Natural se encontram na forma de agregados moleculares em equilíbrio estável com as moléculas livres.

A dinâmica medida acima é de fundamental importância para estabelecer estratégias para o uso terapêutico da curcumina.

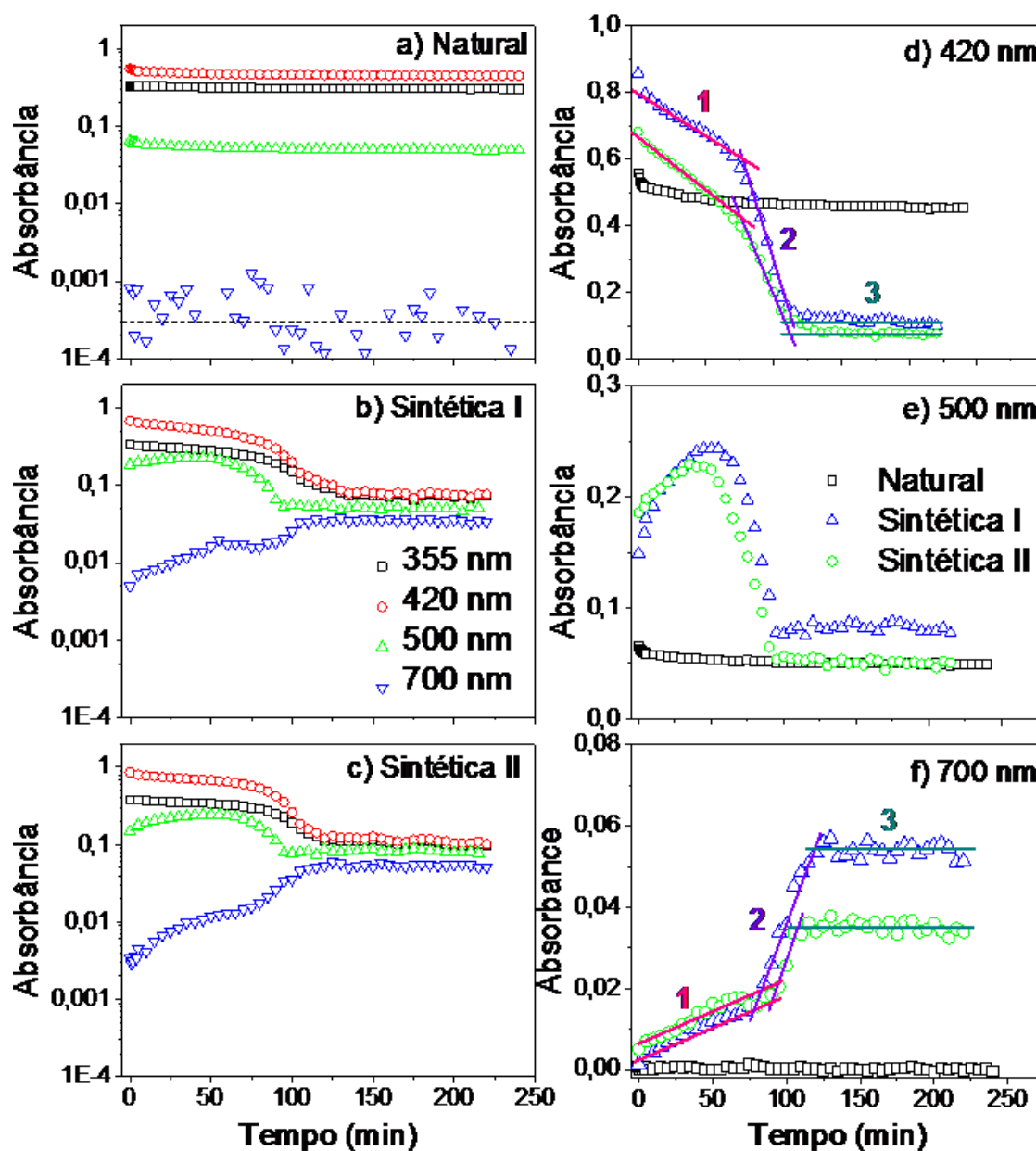


Gráfico 5 - Dinâmica temporal da densidade óptica nos comprimentos de onda de 355 nm, 420 nm, 500 nm e de 700 nm para avaliação dos três tipos de curcuminas. Observa-se primeiramente a estabilidade da curcumina Natural em relação às outras duas que apresentam comportamento semelhantes ao longo do tempo. Acredita-se que a primeira subida da curva de espalhamento esteja associada à conversão de agregados moleculares para particulados, enquanto a segunda subida esteja associada à conversão de ambas formas livres diretamente para o aumento de tamanho dos agregados particulados.

Fonte: Elaborado pelo autor

Ao monitorar as densidades ópticas nos comprimentos de onda de 355 nm, 420 nm, 500 nm e de 700 nm, relativos aos estados livres e agregados para cada tipo de curcumina durante o tempo de estabilização das soluções de curcumina (Gráfico 5),

observamos uma grande estabilidade para a curcumina Natural, uma taxa de conversão das curcuminas nas formas livres e de agregados moleculares para agregados particulados para a curcumina Sintética e da Sigma.

Também, nota-se um efeito inesperado para a curcumina Sintética, quando comparado às outras duas, na qual há um decaimento na densidade óptica nos comprimentos de onda escolhidos para a análise.

Especificamente, para as curcuminas Sintética e Sigma, acredita-se que a primeira subida da curva de espalhamento está associada à conversão de agregados moleculares para particulados, enquanto a segunda subida está associada à conversão de ambas formas livres diretamente para o aumento de tamanho dos agregados particulados, provavelmente ligando-se à superfície destes, uma vez que essas conversões podem ser observadas em tempos distintos.

5.2 Internalização de curcumina em biofilmes

Esta seção é dedicada ao estudo da internalização da curcumina em *S. mutans* nas formas de biofilme e planctônica através de microscopia confocal utilizando excitação por 2 fótons em 800 nm. Figura 8(a) é uma imagem no modo canal de um plano confocal próximo à lâmina de vidro da célula de cultura de uma imagem 3D.

Os perfis laterais de dois cortes transversais (linhas amarela e verde) são mostradas em cima e à direita e dão informação da morfologia dos biofilmes de *S. mutans* contendo curcumina estudados na presente seção. Os biofilmes são homogêneos e possuem espessura máxima de 14 μm .

As Figura 8(b) e (c) mostram imagens no modo canal no mesmo plano focal em alta ampliação da forma planctônica da *S. mutans* cultivada por 24 horas em células de cultura próprias para microscopia.

As bactérias foram coradas com o marcador *live&dead* para avaliar a viabilidade da cultura celular. Uma fração muito pequena das bactérias não viáveis foi corada de vermelho do brometo de etídio. A maioria das células possui a coloração verde do laranja de acridina, indicando a integridade da parede celular, que é o principal requisito para os estudos de internalização de fotossensibilizadores apresentados nessa seção.

O alto contraste nas imagens se deve ao grande acúmulo de curcumina e de marcador no interior da *S. mutans*. É importante salientar que a excitação por 2 fótons e o uso de uma objetiva de 40x-água com abertura numérica $NA=1,2$ produz um volume focal de 0,04 femtolitros (15 vezes menor que o volume da bactéria de 0,6 femtolitros) é capaz de resolver e obter informação do interior de uma única bactéria nos biofilmes.

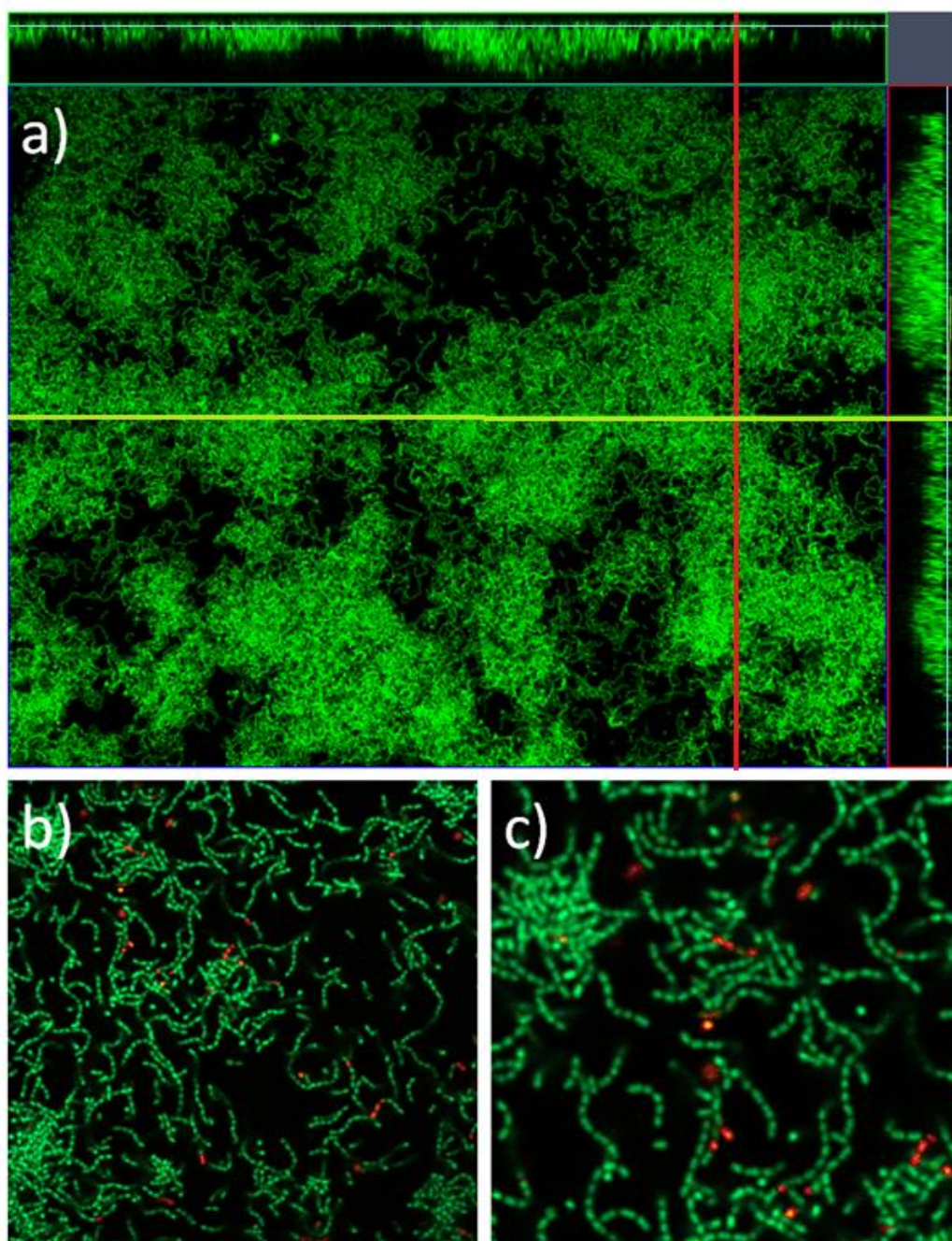


Figura 8 - Imagens de microscopia confocal de *S. mutans* a) coradas com curcumina e com o marcador live&dead para b) menor e c) maior ampliação
Fonte: Elaborada pelo autor.

Biofilmes de *S. mutans* não muito densos foram preparados nas mesmas condições para os estudos da internalização da curcumina. Um exemplo de biofilmes contendo curcumina pode ser visto na imagem no modo espectral de um corte confocal desse biofilme (Figura 9(a)).

Esse experimento utilizou solução aquosa (PBS) com curcumina SIGMA na concentração de 167 μM e tempo típico de incubação por 1 hora. A Figura 9(b) compara espectros de emissão da curcumina medidos em três regiões de interesse (ROI) distintas: no biofilme (ROI 1), no particulado (ROI 2) e na solução (ROI 3).

A curcumina internalizada na *S. mutans* (ROI 1) apresenta emissão deslocada para o azul com máximo em 495 nm, típica de curcumina na forma livre (não agregada).

Já particulados de curcumina (ROI 2) apresentam coloração amarela e emissão deslocada para o vermelho com máximo em 558 nm. A emissão da curcumina em solução é muito pequena (ROI 3) devido ao estado agregado dessa molécula.

Estas características conferem um alto contraste de intensidade e nos modos espectral e de tempo de vida nas imagens confocal, o que permite que cada bactéria seja resolvida individualmente no biofilme.

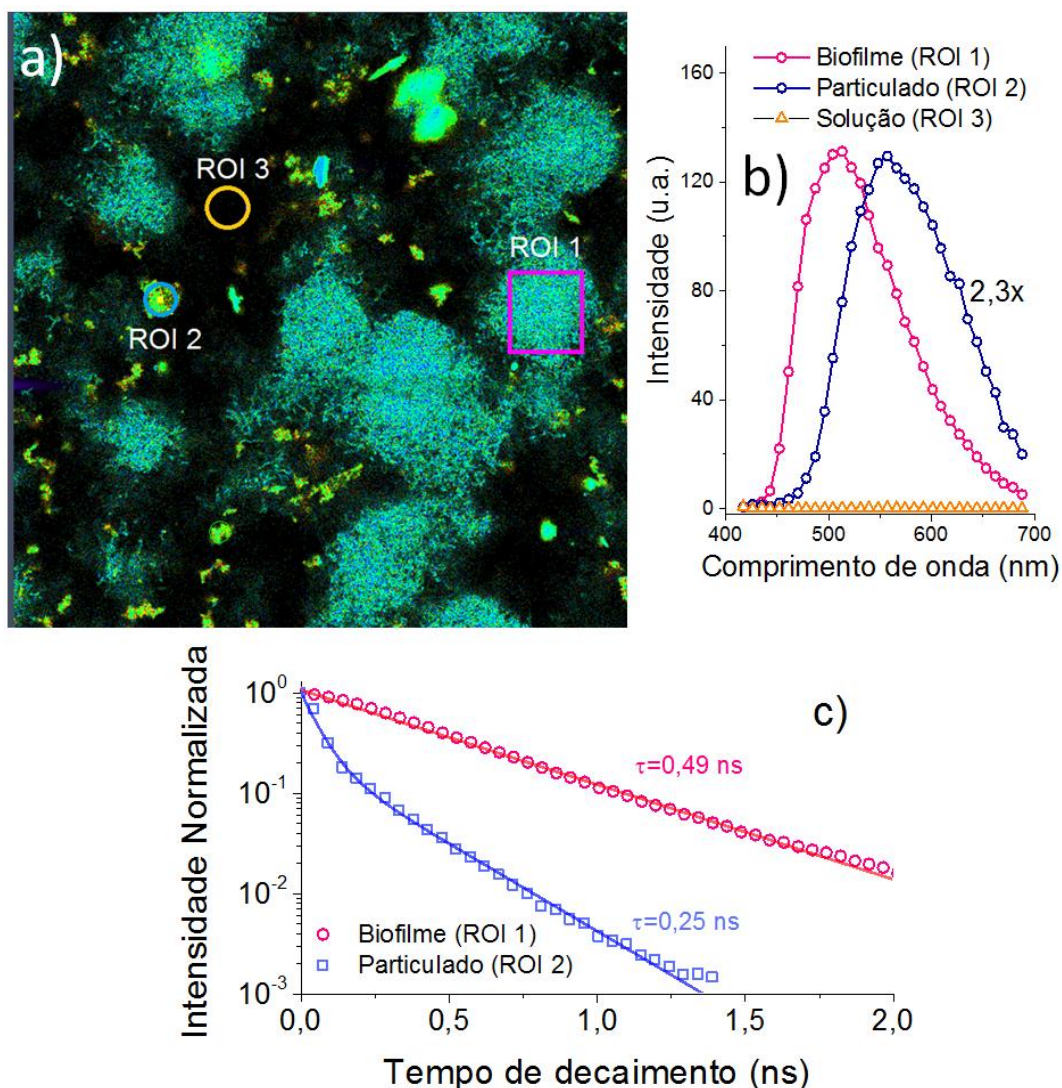


Figura 9 - a) Imagem de um corte confocal de biofilme após incubação por 1 hora em solução aquosa (PBS) de curcumina SIGMA na concentração de $167 \mu\text{M}$. b) Comparação entre espectros de emissão da curcumina medidos em três regiões de interesse (ROI) distintas: no biofilme (ROI 1), no particulado (ROI 2) e na solução (ROI 3). c) Decaimentos da fluorescência da curcumina internalizada em células de um biofilme de *S. mutans* e na forma agregada em particulado

Fonte: Elaborada pelo autor.

Este contraste se reflete nas imagens de tempo de vida (não mostrado). Os decaimentos da fluorescência (Figura 9(b)) da curcumina internalizada é monoexponencial (com tempo de vida $\tau = 0,49$ ns) quando está internalizada nas células de *S. mutans* no biofilme, que é um comportamento característico de molécula livre, condição necessária para se ter alta eficiência na geração de oxigênio singleto durante o processo de fotoinativação.

O decaimento da emissão da curcumina agregada na forma de particulado pode ser ajustado por duas exponenciais com dois tempos de vida mais curtos em

0,10 ns e 0,23 ns. O decaimento rápido da curcumina agregada ou em particulados se deve a processos não radiativos competitivos que elimina o estado excitado e que compete eficientemente com os processos envolvendo o estado excitado na formação de espécies reativas.

A dinâmica da incorporação da curcumina em células de *S. mutans* em biofilme e na forma planctônica pode ser avaliada através séries temporais medidas por microscopia confocal em função da concentração (Gráfico 6). Imagens microscopia confocal foram feitas em intervalos de tempo sucessivos após a introdução de 300 μ L de solução de curcumina SIGMA diluída em PBS na célula de cultura.

Cuidado foi tomado para preparar as soluções de curcumina e introduzi-las imediatamente na célula de cultura para se ter maior concentração da forma livre da curcumina, conforme visto na seção anterior.

O plano confocal foi escolhido próximo à lâmina de vidro para se ter a forma planctônica e o biofilme na mesma imagem (Gráfico 6(d)), bem como para evitar efeitos de filtro interno ou reabsorção da emissão durante a incorporação.

O Gráfico 6 compara a variação da intensidade de emissão da curcumina em função do tempo de incubação dentro do intervalo de 20 min para regiões de interesse dentro do biofilme (círculos abertos), na forma planctônica (quadrados abertos) e em solução (triângulos abertos) para a concentração de curcumina de 169 μ M.

A emissão da curcumina aumenta exponencialmente conforme o ajuste (linhas contínuas) através da função $I = I_{sat} [1 - \exp(-t/t_0)]$ em diferentes tempos característicos t_0 até atingir o regime de saturação I_{sat} . O tempo t_0 obtido no ajuste exponencial é de 3,5 min para o biofilme e de 1.1 min para a forma planctônica.

O tempo de internalização longo nas células na região de interesse dentro do biofilme deve incluir o processo lento de permeação da molécula livre ao longo da matriz porosa de polissacarídeos do biofilme estudado neste trabalho.

Já o tempo mais curto de internalização na forma planctônica inclui a interação da curcumina livre com a parede celular e a sua difusão por essa parede até atingir o meio citoplasmático.

Pode-se ver na Gráfico 6(a) uma grande diferença entre as intensidades medidas na forma planctônica e no biofilme. Esta incorporação diferente para o biofilme e para a forma planctônica impõe certa seletividade na fotoinativação das bactérias será discutido mais a frente.

O regime de incorporação fora do equilíbrio, descrito pelo termo exponencial, depende do gradiente de concentração e do coeficiente de difusão no meio dado pelas leis de Fick.⁷³ Já no regime de saturação, o gradiente de concentração é nulo e a difusão é descrita em termos do movimento browniano dado pela teoria de Einstein.

74

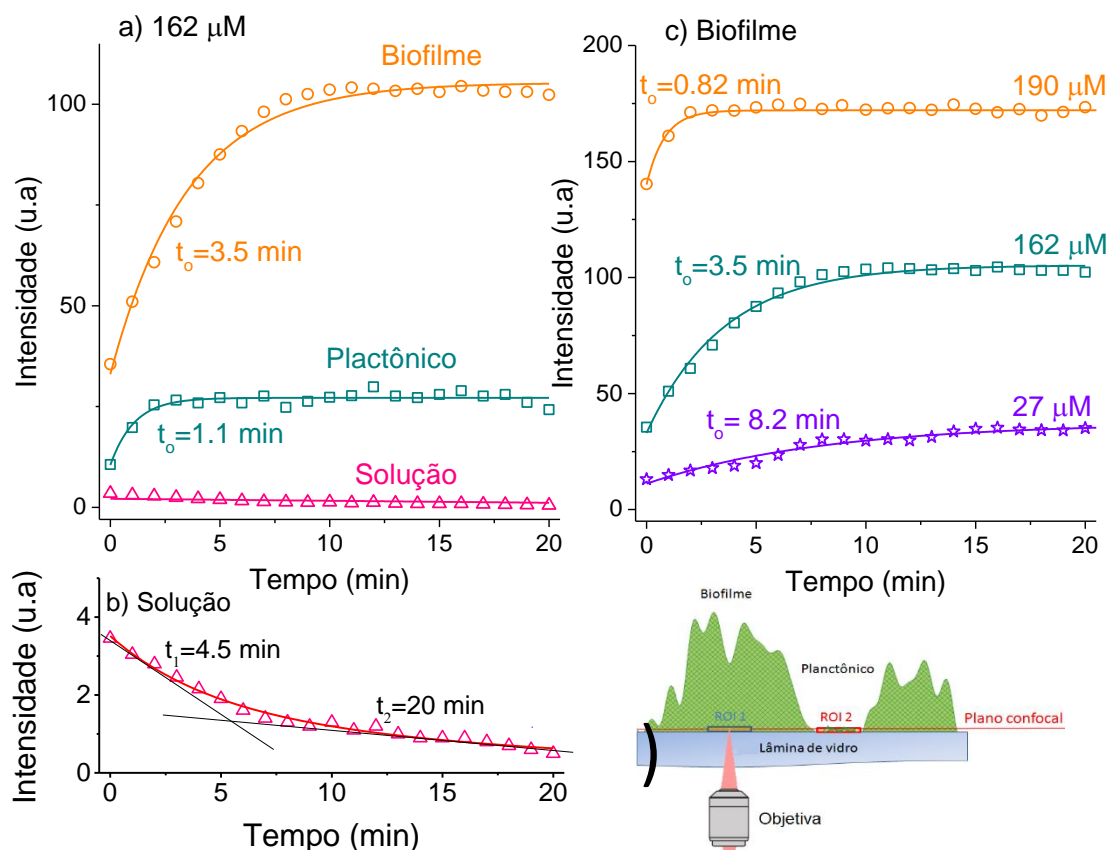


Gráfico 6 - a) Variação da intensidade de emissão da curcumina em função do tempo de incubação dentro do intervalo de 20 min para regiões de interesse dentro do biofilme (círculos abertos), na forma planctônica (quadrados abertos) e em solução (triângulos abertos) para a concentração de curcumina de 167 µM. b) Dependência da mesma emissão em solução em escala ampliada. c) Dependência da intensidade de emissão da curcumina em biofilme para várias concentrações. d) Esquema da configuração óptica usada para a tomada da imagem.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como a intensidade da emissão da curcumina em solução é baixa, a Gráfico 6 (b) mostra dependência dessa emissão em escala ampliada. Nesse caso, a intensidade decresce com o tempo de incubação e esse comportamento pode ser ajustado por duas exponenciais decrescentes: uma queda inicial rápida dada por uma constante de tempo t igual 3,5 min e outra com queda mais lenta com t igual a aproximadamente 20 min.

A queda rápida da intensidade pode ser explicada pela depleção da pequena fração de curcumina livre em solução devido a sua incorporação nas células de *S. mutans* presentes na solução no biofilme e na forma planctônica (ver Gráfico 6(a)). A segunda queda se deve às perdas da curcumina livre no processo lento de formação de agregados e particulados descritos na seção anterior.

É importante estudar a dependência da internalização da curcumina em função da concentração. O processo de permeação molecular em uma matriz porosa de um biofilme depende basicamente do coeficiente de difusão da curcumina na solução salina de PBS e do gradiente local de concentração molecular que é influenciado pelas perdas de curcumina para a matriz através da internalização nas células ou pelas interações com a rede local de polissacarídeos.

Esse processo de permeação na matriz do biofilme entra no regime estacionário quando o gradiente de concentração da molécula livre é zero.

A Gráfico 6(c) compara a dependência temporal da incorporação da curcumina em biofilme de *S. mutans* para várias concentrações molares. Pode-se ver que o tempo característico de incubação t diminui com o aumento da concentração nominal de curcumina na solução de PBS.

Este resultado segue a primeira lei de Fick, ou seja, o fluxo de curcumina depende do gradiente de concentração de curcumina. Aqui, deve-se considerar a concentração da fração de curcumina livre, não agregada, que têm coeficiente de difusão maior.

Este resultado indica que a fração de curcumina livre na solução nas condições do experimento é proporcional à concentração nominal de dessa molécula na solução. O aumento da intensidade da emissão da curcumina na condição de saturação para a curcumina no biofilme também corrobora para a veracidade desta afirmativa.

A Gráfico 6(a) mostra que a intensidade da emissão da curcumina acumulada dentro da célula no biofilme é pelo menos 4 vezes maior que a emissão nas células planctônicas. É importante salientar não é um artefato de captação de luz em um meio mais denso pelo volume confocal, que é capaz de resolver a forma de uma bactéria isolada conforme a Figura 8.

Este volume é da ordem de $0,03 \mu\text{m}^3$ ($\sim 0,03$ femtolitros) para a objetiva utilizada de imersão em água e abertura numérica de $1,2^{75}$ enquanto que o volume médio da *S. mutans* é de $0,6 \mu\text{m}^3$.

Desta forma, a emissão medida pelo microscópio é aquela provinda do interior de uma única célula de *S. mutans*. Nessa condição de saturação, a concentração de curcumina livre dentro e fora da célula deve ser a mesma, conforme será visto mais a frente.

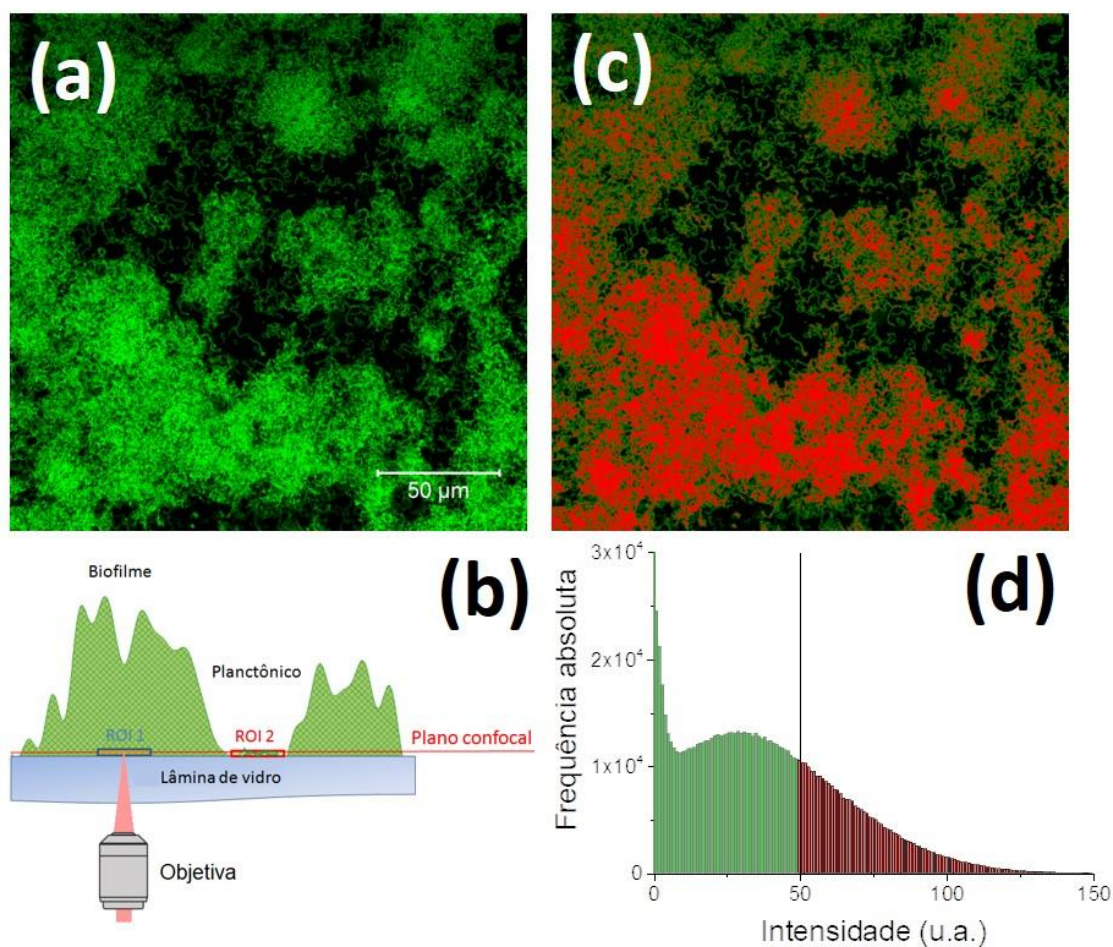


Figura 10 - a) Imagem no modo canal de um plano focal próximo à lâmina de vidro de *S. mutans* na forma de biofilme e planctônica para curcumina em PBS na concentração de 169 μM . b) Esquema da configuração óptica para a imagem. c) A mesma imagem, para a qual os pixels com intensidade maior que 50 foram marcados de vermelho conforme d) histograma que fornece o número de píxeis para cada intensidade medida.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 11(a) é a imagem no modo canal de um plano focal próximo à lâmina de vidro de *S. mutans* (Figura 11(b)) na qual estão presentes as formas de biofilme e planctônica expostas à curcumina na concentração de 169 μM em PBS.

Os biofilmes têm espessura de aproximadamente 14 μm . O contraste nessa imagem é muito grande entre as intensidades de emissão na solução (preto) e no biofilme (verde mais intenso). A Figura 11(c) é a mesma imagem (contendo 989

kpíxeis), em que os píxeis com intensidade maior que 50 (34% dos pixels) foram marcados de vermelho conforme o histograma da Figura 10(d) que fornece o número de píxeis para cada intensidade medida.

Observe que os píxeis marcados de maior intensidade tem origem nos biofilmes. Os píxeis correspondendo a intensidades próximas de 0 (em preto) estão associados à emissão da curcumina em solução devido à baixa concentração de curcumina livre e a presença de agregados de baixa eficiência de emissão.

Emissões intermediárias têm origem nas bordas do biofilme e na forma planctônica da *S. mutans*. Emissões com origem nas células são eficientes e se deve ao alto acúmulo da molécula livre nessa bactéria.

O espectro de emissão da curcumina pode dar uma informação qualitativa de sua concentração no meio celular ou em solução. Geralmente, agregação molecular gera estados eletrônicos de agregados de baixa energia.

Excitação por 2 fótons pode acessar estes estados de agregados de forma seletiva e o deslocamento espectral para o vermelho depende da natureza e da concentração desses agregados.

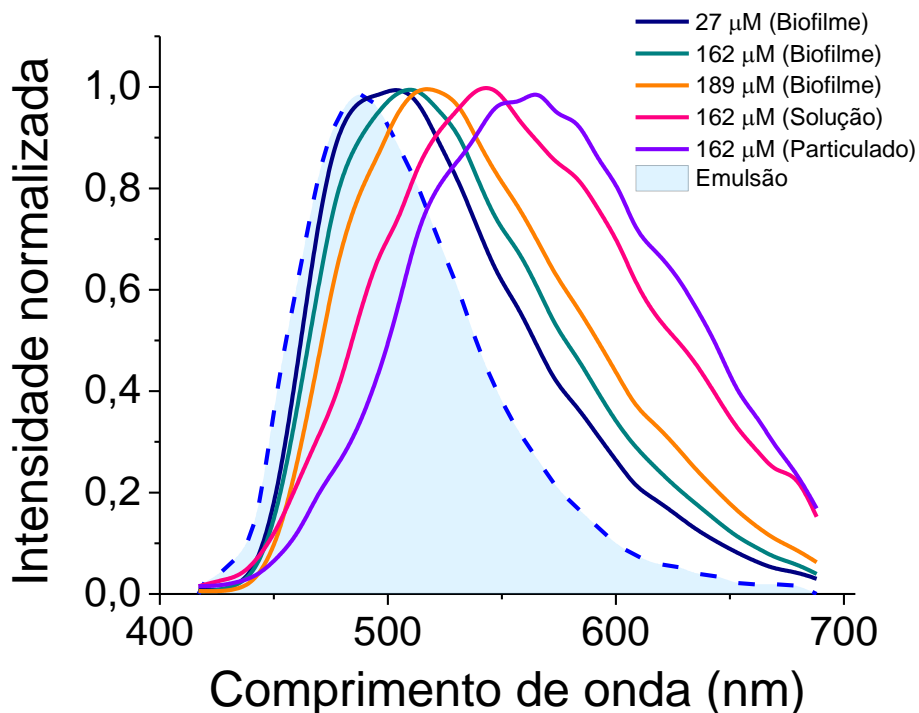


Gráfico 7 - Comparação entre espectros de emissão da curcumina em diferentes meios para diferentes concentrações. O espectro de curcumina em emulsão em baixa concentração é usado como referência,

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Gráfico 7 compara espectros de emissão da curcumina em diferentes meios para diferentes concentrações. O espectro de curcumina em emulsão em baixa concentração, usado como referência, apresenta emissão estreita na faixa do azul (488 nm).

O espectro da curcumina formando particulado é largo com máxima intensidade em 566 nm. A emissão da curcumina dentro das células no biofilme se desloca para o vermelho com o aumento da concentração nominal da solução de PBS, o que leva ao aumento da concentração da curcumina nas células e a formação de agregados (Gráfico 6(c)).

A curcumina dispersa em solução de PBS de 169 μM apresenta máximo de emissão em 543 nm e, portanto, se encontra na forma agregada. Pode-se inferir destes resultados que esse agregado molecular se desfaz em curcumina livre ao interagir com o biofilme ou com a parede celular da bactéria, permitindo o acúmulo eficiente nas células.

Geralmente, o interior de biofilmes têm $\text{pH} < 5,5$.⁷⁶ É interessante notar a incorporação da curcumina no biofilme de *S. mutans* não é prejudicado por este meio ácido (Figura 11(c)), o que é favorável para a desconstrução do biofilme por PDI no ambiente bucal.

É interessante investigar o processo de internalização uma vez que as células da forma planctônica internalizam a curcumina livre enquanto ela se encontra na forma agregada fora do ambiente celular. Para isso é preciso entender se a curcumina internalizada se encontra ligada sem formar agregados a algum tipo de organela no interior das células ou se ela se encontra livre nesse ambiente.

A técnica que mede a recuperação da fluorescência após fotodegradação (do inglês, *Fluorescence Recovering After Photodegradations* ou FRAP) pode dar informações sobre o estado molecular ligado ou livre no interior das células sem alterar o estado de equilíbrio estacionário (a difusão molecular é regida apenas pelo movimento Browniano⁷⁷ e não por gradiente de concentração).

Cuidado principal deve ser tomado para que a fotodegradação não produza dano à parede celular que controla o fluxo molecular. Os dados acima mostram que a *S. Mutans* acumula muito mais curcumina no seu interior do que aquela que se encontra no meio externo dentro do biofilme na saturação.

A Figura 11(a) ilustra como foi feito o experimento de FRAP. Primeiramente, a imagem no modo canal foi feita em um plano focal próximo à lâmina de vidro da célula de incubação contendo solução de curcumina em PBS a 169 μM .

A área escolhida para a fotodegradação corresponde ao quadrado vermelho (ROI 1) de um biofilme espesso. As regiões de controle do experimento são a de um biofilme (ROI 2) fora da ROI 1, a ROI 3 na solução e a ROI 4 sobre um particulado.

A Figura 11(b) é o gráfico log da intensidade de emissão da curcumina avaliada nessas regiões em função do tempo de aquisição das imagens definido pelos pontos abertos. Os pontos abertos vermelhos mostram que foram realizados uma sequência de 5 fotodegradações no plano da ROI 1.

Cada fotodegradação foi feita até a intensidade de emissão cair 20%, o que é feito com uma dose de luz de aproximadamente 0,6 J/cm^2 . Esta dose está abaixo do limiar para produzir danos na membrana.

A partir desse limite foram realizadas 20 imagens a cada 30 segundos para acompanhar a recuperação da fluorescência e assim sucessivamente. As intensidades no particulado e na solução se mantiveram constantes ao longo de todo o experimento.

Já a emissão da curcumina caiu no biofilme da ROI 2 devido à fotodegradação produzida durante a varredura das inúmeras imagens utilizadas para o experimento.

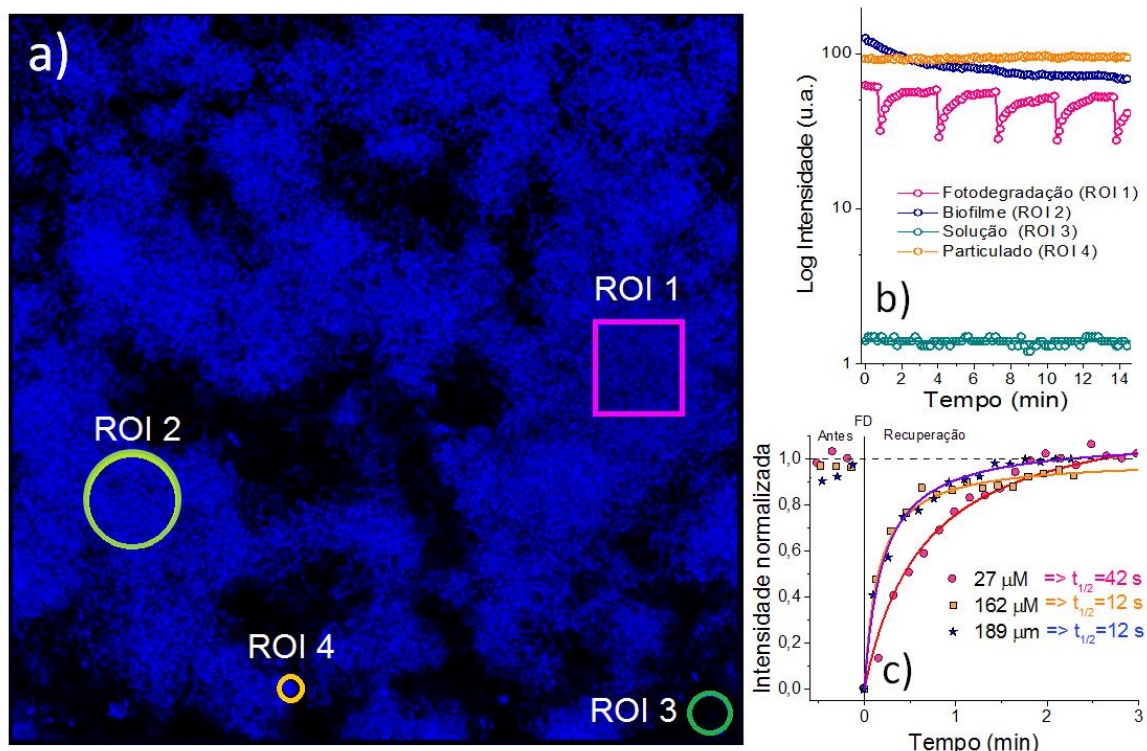


Figura 11 - a) Regiões de interesse no experimento de FRAP na imagem no modo canal para as condições de solução de curcumina em PBS a $169 \mu\text{M}$. b) Gráfico log da intensidade de emissão da curcumina avaliada nessas regiões em função do tempo de aquisição das imagens. c) Comparação da recuperação da fluorescência para várias concentrações (pontos abertos) e as linhas contínuas são ajustes por funções que descrevem o processo através de um tempo característico $t_{1/2}$.

Fonte: ROMANO.¹⁵

É interessante observar na Figura 11(b) que há uma recuperação de 100% na fluorescência avaliada na região fotodegradada no interior do biofilme. Este patamar de recuperação, bem como a taxa de recuperação não varia para as fotodegradações sucessivas.

Estes resultados indicam que a dose entregue para fazer os 20% de fotodegradação não é suficiente para danificar a membrana. Resultados no nosso grupo¹⁵ mostram que o dano na membrana produz maior internalização de fotossensibilizadores, ou seja, a taxa de troca das moléculas fotodegradadas aumenta e a recuperação é maior que 100% nesse caso.

Como a fluorescência se origina da curcumina no interior das células, a recuperação se deve à troca das moléculas fotodegradadas nesse ambiente pelas moléculas de curcumina não degradadas que entram no plano da ROI 1 por difusão simples limitada pela matriz porosa do biofilme e pela parede celular da bactéria.

A recuperação total da fluorescência depende da concentração como pode ser visto pelos dados experimentais (pontos abertos) na Figura 11(c). O processo de recuperação da fluorescência descrito pelos ajustes (linhas contínuas) não é uma função simples.¹⁵

Por isso, o valor do tempo $t_{1/2}$ para a recuperação de 50% da intensidade foi utilizado como parâmetro típico. Os tempos $t_{1/2}$ medidos estão entre 12 e 42 s para concentrações entre 27 e 189 μM . Os tempos $t_{1/2}$ são muito menores aos medidos na Gráfico 6, pois o processo de internalização naquele caso envolve da permeação lenta pelo biofilme.

Assim, podemos concluir que a internalização da curcumina é limitada pelo processo de permeação e não pela internalização na membrana celular.

O resultado anterior mostra que doses de luz menores que 1 J/cm^2 entregues nas condições do microscópio confocal não produz dano à parede celular da *S. Mutans*. Estas condições de iluminação não alteram também o processo de incorporação da curcumina nas células. É interessante investigar as doses que são suficientes para provocar alterações na parede de modo a produzir morte celular.

O experimento a seguir pretende entender melhor aspectos associados à inativação das células pela ação da luz após a internalização da curcumina. Aqui é importante determinar a dose de luz necessária para produzir desativação à célula através de danos associados principalmente à parede celular para uma dada dose de curcumina.

O experimento é composto por duas partes. A primeira parte seria a aplicação de doses altas ($D \gg 1 \text{ J}/\text{cm}^2$) sucessivas e acompanhar sistematicamente o seu efeito acumulativo após cada dose luz através de microscopia confocal. Efeitos importantes seriam, por exemplo, a fotodegradação da curcumina e mudanças das taxas de incorporação dessa molécula através da parede celular.

A segunda parte, seria acompanhar a evolução da atividade microbial após a aplicação da dose total através de uma série temporal de imagens utilizando baixa dose ($D \ll 1 \text{ J}/\text{cm}^2$) sem produzir danos ou fotodegradação mensuráveis.

Nessa parte serão utilizados marcadores fluorescentes que têm internalização seletiva pela parede celular, mas a parede perderia a seletividade após a produção de danos irreversíveis.

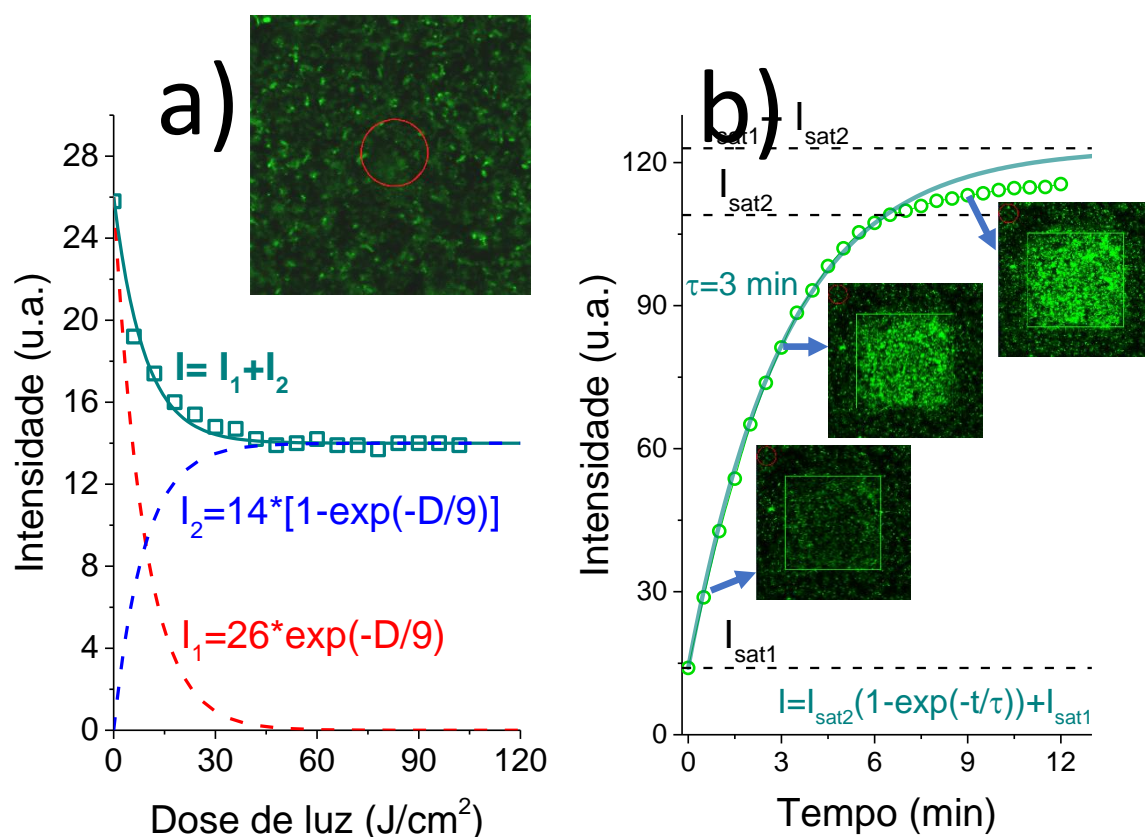


Gráfico 8 - a) Primeira parte: intensidade da emissão da curcumina dentro da região de interesse (círculo em vermelho da imagem inserida) em função da dose acumulada. A linha pontilhada é a superposição de dois efeitos descritos por I_1 e I_2 para a mesma dose característica de 9 J/cm². b) Segunda parte: evolução temporal da intensidade emissão da curcumina (pontos abertos verdes) no interior mesma região da primeira parte (quadrado verde) medida logo após a aplicação da dose de aproximadamente 100 J/cm² da primeira parte. A figura mostra três imagens em três tempos distintos da serie temporal.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na primeira parte, doses de luz sequenciais são aplicadas em uma região do plano confocal dentro de um biofilme de *S. Mutans* em PBS contendo curcumina a 162 μ M. Uma dose nominal de aproximadamente 6 J/cm² é aplicada por pixel de imagem para cada imagem sucessiva da região analisada.

O tempo por imagem é de 30 s. A imagem da região do plano focal para dose zero está inserida na Gráfico 8(a). A figura também mostra a intensidade da emissão da curcumina dentro da região de interesse (círculo em vermelho) em função da dose acumulada.

A intensidade medida cai rapidamente 46% do valor inicial antes de saturar para uma dose acima de 30 J/cm². Esse comportamento da emissão da curcumina I no interior das células (curva contínua verde) pode ser explicado pela superposição de dois efeitos que ocorrem concomitantemente.

O primeiro efeito está associado ao decréscimo da intensidade de emissão I_1 devido a fotodegradação da curcumina e que é descrita por uma exponencial decrescente $I_1 = I_{01}[\exp(-D/D_0)]$ (curva pontilhada vermelha), que para o caso, o valor da dose típica D_0 é igual a 9 J/cm^2 , sendo que I_{01} é a intensidade inicial na primeira parte do experimento.

O segundo efeito se deve ao aumento da internalização de curcumina produzido por danos irreversíveis na parede celular produzidos pela curcumina no processo de inativação induzido por luz. Cada dose aplicada produz o aumento do dano acumulado e maior é a internalização.

Portanto, o aumento da intensidade da curcumina no interior da célula pode descrito pela intensidade I_2 através de um crescimento exponencial dado por $I_2 = I_{\text{sat}1}[1 - \exp(-D/D_0)]$ (curva pontilhada vermelha) com o mesmo valor da constante $D_0 = 9 \text{ J/cm}^2$.

A constante $I_{\text{sat}1}$ dá a saturação desse processo, já que a fotoatividade da curcumina é reduzida pelo rápido processo de fotodegradação descrito por I_1 no primeiro experimento. Assim, o comportamento da a intensidade de emissão da curcumina com a dose aplicada é bem descrito pela superposição destes dois efeitos, ou seja, $I = I_1 + I_2$. $D_0 = 9 \text{ J/cm}^2$ é a dose que produz a redução de 63% das curcuminas ativas dentro da região estudada.

Nessa situação, a curcumina foi excitada 3×10^3 vezes antes de se autofotodegradar pelas espécies reativas que produz. Moléculas como a rodamina são robustas a ponto de serem fotoexcitadas 10^6 a 10^7 vezes antes de se fotodegradar.⁷⁸

A passagem do estado excitado singlete para o tripleto por conversão interna é muito restrito nessas moléculas robustas. Já esse processo é muito provável para a curcumina, o que faz dela um bom fotossensibilizador. Fotodegradação de uma molécula significa que ela é um bom gerador de estado excitado tripleto e, conseqüentemente, pode ser um bom gerador de espécies reativas.

A segunda parte do experimento pretende mostrar que a parede celular sofreu os danos irreversíveis conforme descrito acima. Esse experimento acompanha a evolução temporal da intensidade emissão da curcumina no interior mesma região da primeira parte (quadrado verde), medida logo após da aplicação da dose final de aproximadamente 100 J/cm^2 na primeira parte.

Na segunda parte, a área da imagem foi ampliada para fazer comparação entre uma área não irradiada e aquela que sofreu a aplicação de doses sucessivas (Gráfico 8(b)). Essa figura mostra três imagens em três tempos distintos da serie temporal e a evolução da intensidade da emissão (pontos abertos verdes) dentro das células medida na região da área do quadrado verde em função do tempo.

Nesse caso, as doses utilizadas por pixel de imagem foram menores que 1 J/cm^2 , o que não produz danos ou fotodegradação mensuráveis durante a microscopia utilizando curcumina. Pode-se ver que a intensidade dessa molécula no interior das células aumenta gradativamente até 8 vezes do valor da intensidade de saturação I_{sat} , obtida no final da primeira parte do experimento, até atingir um processo de saturação após 6 min.

Esse comportamento descreve o acúmulo gradativo da curcumina no interior da célula que atravessa a membrana através dos danos feitos na parede celular. O aumento da curcumina nas células é dado por uma exponencial crescente da forma $I = I_{\text{sat}2}[1 - \exp(-t/t_2)] + I_{\text{sat}1}$ (curva verde contínua) sendo que $t_2 = 3 \text{ min}$ é o tempo característico do crescimento exponencial e $I_{\text{sat}2}$ a intensidade de saturação final do processo.

Pode-se ver na Gráfico 8(b) que a intensidade medida é menor que a prevista na saturação. Isto pode ser explicado pela fotofísica envolvendo moléculas de curcumina. O processo final de internalização acumula muita curcumina no interior das células o que gera agregados moleculares que têm baixa eficiência de emissão.

Os deslocamentos espectrais observados na Gráfico 7 são assinaturas desse processo de agregação. O aumento da emissão com tempo típico de 3 min se deve ao processo de permeação/difusão lento ao longo do biofilme (que é o mesmo tempo observado para a concentração de $162 \mu\text{M}$ na Gráfico 6(a)), que é responsável para suprir o processo de internalização de curcumina. Observe que as células fora da área degradada sofrem pouca variação de intensidade.

Os danos produzidos pela curcumina excitada na permeabilidade da parede das células após o experimento descrito acima podem ser avaliados através do uso do marcador *life&dead*.

A Figura 12 apresenta a imagem que contem a região (quadrado branco) que foi irradiada no experimento anterior e a área maior que não sofreu o efeito da dose aplicada de 100 J/cm^2 . O marcador laranja de acridina (verde) é internalizado nas células independente do estado parede.

Já o brometo de etídio (vermelho) só é internalizado se a parede sobre danos por necrose, indicando a inviabilidade da célula. Pode-se ver que as células na área que sofreu irradiação estão todas inviabilizadas devido a produção de danos permanentes na parede da *S. Mutans*, o que demonstra o efeito da inativação fotodinâmica nessas células.

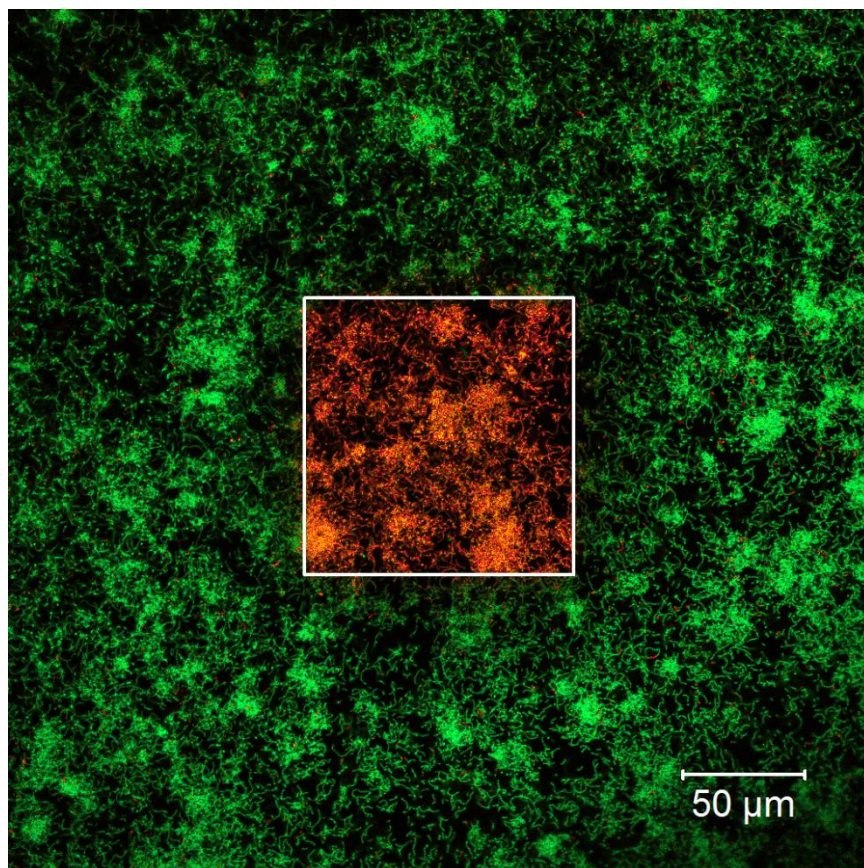


Figura 12 - Imagem de microscopia confocal no modo canal que contém a região (quadrado branco) que foi irradiada no experimento anterior e a área maior que não sofreu o efeito da dose aplicada de 100 J/cm^2 . A cor verde indica a presença do marcador laranja de acridina e que viabilidade das células. Já a cor vermelha é uma indicação da internalização do brometo de etídio através da parede que sofreu necrose ou danos permanentes, que indicam a inviabilidade da célula.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 Caracterização óptica das bactérias

O objetivo dos experimentos seguintes foi o emprego de metodologias ópticas a fim de caracterizar e quantificar as bactérias. Além disso, nesta etapa também buscou-se encontrar uma condição satisfatória de centrifugação a fim de que ao término dos procedimentos de centrifugação, lavagem em solução salina e resuspensão do *pellet*

as bactérias fossem obtidas em sua forma planctônica nas condições de maior liberdade possível.

Condição esta que fosse considerada a ideal para os experimentos posteriores por garantir o arraste dos microrganismos, mas que também que fosse de fácil e rápida resuspensão do *pellet* formado no fundo do tubo, do tipo *Falcon* de 50 ml.

Isso tudo para que ao observá-las no microscópio confocal não fossem obtidos glomérulos de amontoados bacterianos e sim que as bactérias estivessem na sua forma planctônica a mais livre possível para efetivas observações e análises, pois como já é sabido, altas centrifugações podem causar o cisalhamento da superfície celular bacteriana e com isso a sua inviabilidade.⁷⁹ Embora muitos protocolos experimentais prefiram altas velocidades de centrifugação para coletar o maior número possível de bactérias, assumindo que isso não cause nenhum dano às células bacterianas ou a consequente morte celular.^{79, 80, 81}

Com o intuito apenas de organizar visualmente os dados obtidos e facilitar as comparações futuras, utilizaremos cores específicas para cada uma das bactérias analisadas da seguinte forma: todos os gráficos em que foram obtidos quando trabalhados com a bactéria *Escherichia coli*, *E. coli*, terão a cor azul escuro, a cor vermelho escuro quando trabalhados com a bactéria *Staphylococcus aureus*, *S. aureus*, e a cor verde para a bactéria *Streptococcus mutans*, *S. mutans*.

No primeiro experimento de centrifugação realizado para a bactéria *E. coli* em que se obteve o Gráfico 9, foram realizadas 12 medidas de absorvância para uma mesma concentração de bactérias *E. coli*, com UFC médio de $1,2 \times 10^9$ bactérias por ml. Então, pegou-se a amostra e centrifugou-a durante 10 minutos inicialmente a 800 rpm (ou 100 x g) na centrífuga de bancada *Eppendorf AG* modelo 5702 série 5702AO929207 e mediu-se a absorvância de uma alíquota de 2 ml do sobrenadante no espectrofotômetro Cary UV-Vis 50, Varian.

Vale ressaltar que a micropipeta era sempre posicionada no centro do tubo a uma distância segura do fundo deste tubo ou do *pellet* que ia sendo formado a fim de garantir o não ocasionamento de uma possível turbidez que revolvesse, deslocasse ou mesmo remexesse o *pellet* que ia sendo formado.

De forma que isso não interferisse nas medidas e que se minimizasse o erro característico desse tipo de medida. Em seguida, realizou-se a resuspensão e agitação do meio no vórtex Gehaka -AV2, em modo contínuo do movimento orbital em

2500 rpm, por um tempo de no máximo 30 segundos de modo que não restassem nenhum vestígio de grânulo do *pellet* a olho nu.

Então, repetiu-se o procedimento de centrifugação aumentando-se em 200 rpm a velocidade, isto é, de 800 rpm para 1000 rpm (157 x g). Após os 10 minutos de centrifugação, realizou-se outra medida de absorvância do sobrenadante e a conseguinte resuspensão.

Este processo foi repetido sequencialmente ao longo de 12 vezes de modo que as curvas de absorvância mostradas no Gráfico 9 foram sendo obtidas de cima para baixo. Fato este observado devido à relação inversa entre a concentração do meio centrifugado em questão e o aumento da velocidade de rotação da centrífuga, quer dizer, conforme aumentou-se a rotação da centrífuga notou-se o aumento do *pellet* que ia sendo formado e, conseqüentemente, o abaixamento da curva de absorvância que ia sendo gerada no espectrofotometro devido à diminuição da concentração do meio centrifugado.

Ao serem colocadas no gráfico monologarítimo evidenciou-se a correlação inversa entre as diferentes medidas de absorvância e as respectivas velocidades de rotação, ou seja, conforme aumentou-se a rotação da centrífuga a curva de absorvância que mostrou o espalhamento da amostra centrifugada diminui.

Notam-se que as curvas apresentam um espalhamento da ordem de $\lambda^{-1,7}$ para a *E. coli* característico de um espalhamento de pequenas partículas.⁸² Com isso, tem-se a curva específica característica da bactéria *E. coli* estudada, apresentada no Gráfico 9, em vermelho tracejado. Esta curva foi obtida como sendo uma soma de outras duas curvas, apresentadas em preto tracejado. A primeira curva preta tracejada do Gráfico 9, de cima para baixo, é a de $y = 1450 \times \lambda^{-1,5}$ e a outra é $y = 1,5 \times 10^9 \times \lambda^{-4}$. Sendo assim, tem-se que a curva em vermelho tracejado, conforme descrita fica assim:

$$y = 1,5 \times 10^9 \times \lambda^{-4} + 1450 \times \lambda^{-1,5} \quad (1)$$

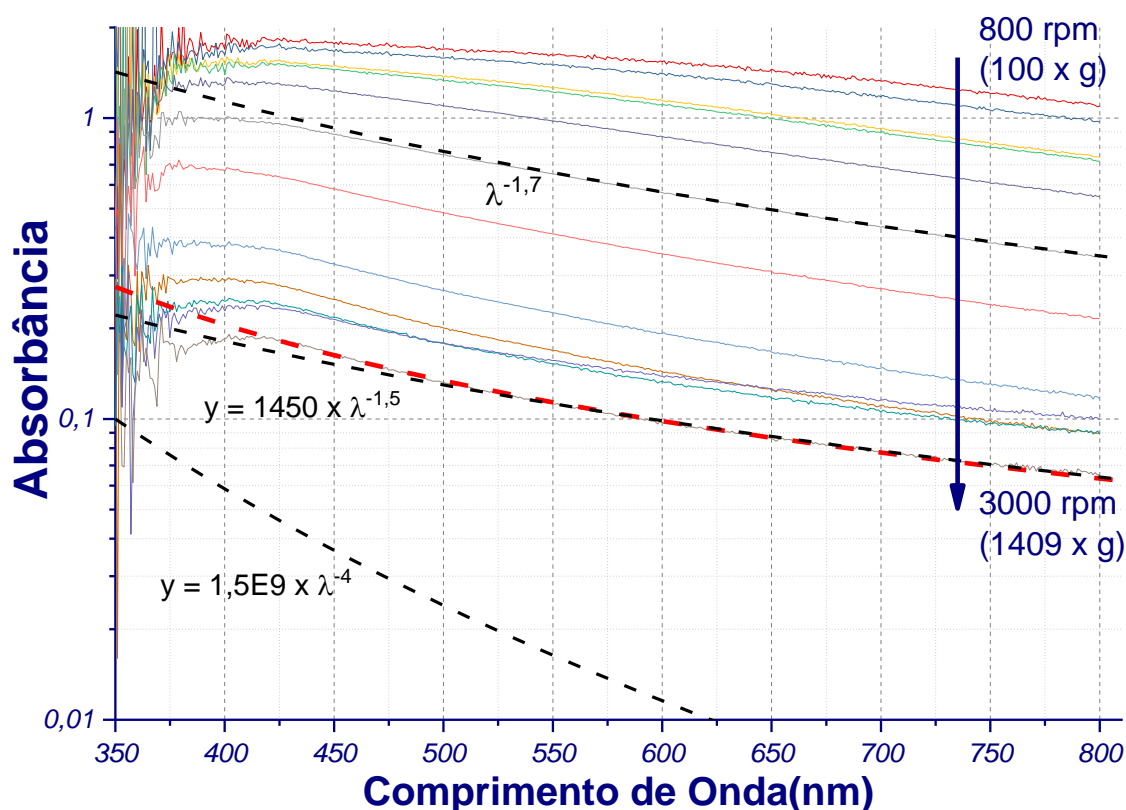


Gráfico 9 - Monologarímetro de 12 medidas do espectro de absorvância na região espectral UV-Vis de alíquotas de 2 ml de sobrenadante bacteriano de *E. coli* lavada em solução salina de PBS, com UFC médio de $1,2 \times 10^9$ bactérias por mililitro de suspensão, em que cada medida foi obtida após a centrifugação por 10 minutos com velocidades que variaram de 800 rpm (100 x g) com incrementos de 200 rpm até 3000 rpm (1409 x g). É possível identificar que a bactéria *E. coli* em solução salina apresenta uma curva com espalhamentos característicos de partículas pequenas com os índices de λ variando de -1,7 até -1,5.

Fonte: Elaborado pelo autor

No segundo experimento, e de mesma natureza em que o anterior, repetiu-se todas as condições experimentais descritas anteriormente no primeiro experimento, empregando-se a mesma análise para a obtenção do Gráfico 9, mas substituindo-se o microrganismo *E. coli* para *S. aureus*.

Então, para a bactéria *S. aureus* o UFC médio foi de $1,3 \times 10^9$ bactérias por mililitro de suspensão. Também se observou a relação inversa entre as curvas que iam sendo geradas com as medidas de absorvância da alíquota do centrifugado e o aumento da respectiva rotação da centrífuga. Isto é, obteve-se novamente a segunda curva, de 1000 rpm, abaixo da curva de 800 rpm, e a de 1200 rpm abaixo da curva de 1000 rpm e assim sucessivamente até os 3000 rpm.

No entanto, por se tratar de um outro microrganismo, conforme foi observado no Gráfico 10, gerado a partir dos dados do experimento com a *S. aureus*, observa-se que são mantidas apenas duas curvas de espalhamento, em relação ao Gráfico 9 obtido com os dados da *E. coli*.

A primeira curva, de cima para baixo com linha tracejada em preto, de espalhamento característico de pequenas partículas da ordem de $\lambda^{-1,7}$ e a última, de cima para baixo também em linha tracejada na cor preta, de $y = 1,5 \times 10^9 \times \lambda^{-4}$. Já a outra curva apresentada de linha tracejada na cor preta apresenta uma outra equação característica, $y = 260 \times \lambda^{-1,28}$, refletindo essa mudança de microrganismo.

Isso pode ter ocorrido devido as diferentes características morfológicas de cada organismo, como a forma e o tamanho, fazendo com que conforme as concentrações dos centrifugados da *S. aureus* fosse diminuindo devido ao aumento da velocidade de centrifugação, as curvas de espalhamento de luz observadas pelo espectrofotômetro fossem alteradas ao serem comparadas com os obtidos com a *E. coli*.

Com isso, pode-se afirmar que a curva característica para a bactéria *S. aureus* estudada, em linha vermelha tracejada no Gráfico 10, é descrita como a soma das duas últimas curvas descritas e assim apresenta-se como:

$$y = 1,5 \times 10^9 \times \lambda^{-4} + 260 \times \lambda^{-1,28} \quad (2)$$

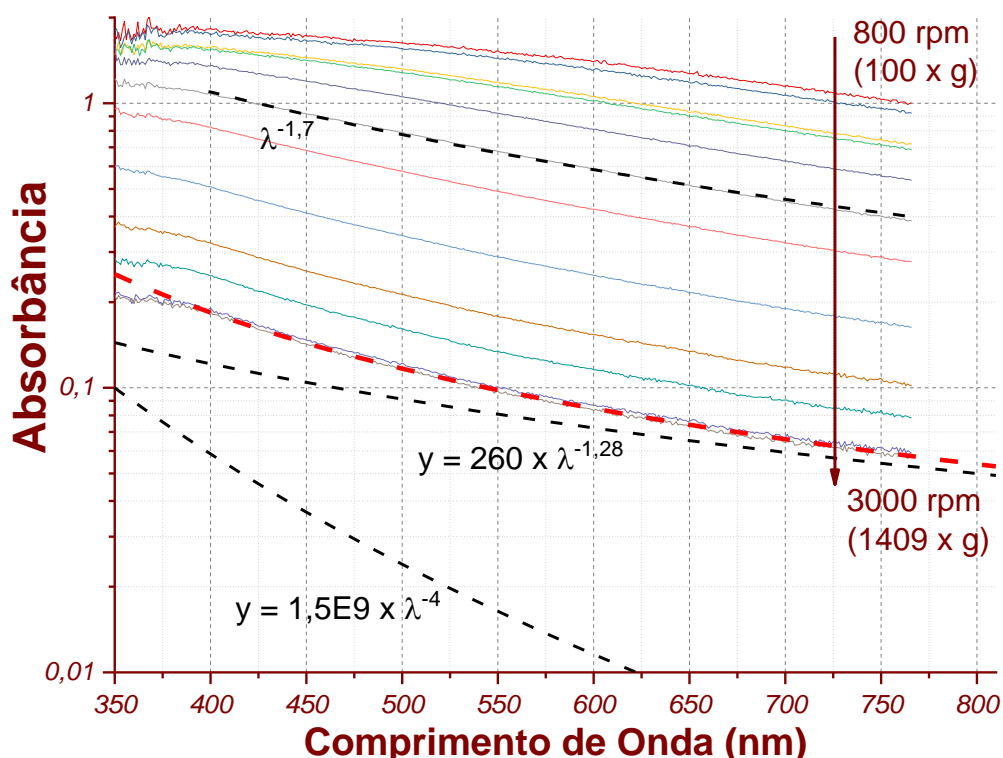


Gráfico 10 - Monologarítmo de 12 medidas do espectro de absorvância na região espectral UV-Vis de alíquotas de 2 ml de sobrenadante bacteriano de *S. aureus* lavada em solução salina de PBS, com UFC médio de $1,3 \times 10^9$ bactérias por mililitro de suspensão, em que cada medida foi obtida após a centrifugação por 10 minutos com velocidades que variaram de 800 rpm (100 x g) com um incremento de 200 rpm até 3000 rpm (1409 x g). É possível identificar que a bactéria *S. aureus* em solução salina apresenta uma curva com espalhamentos característicos de partículas pequenas com os índices do λ variando de -1,7 até -1,28.

Fonte: Elaborado pelo autor

Com os Gráfico 9 e Gráfico 10 desenvolvidos, pode-se então estender a análise das curvas obtidas com as alíquotas de centrifugados e suas respectivas rotações. Para isso, em cada um dos gráficos, anotou-se a absorvância de cada uma das curvas obtidas no comprimento de onda de 600 nm e plotou-se o Gráfico 11.

Conforme pré-definido anteriormente, utilizou-se a cor azul para os pontos obtidos do Gráfico 9 referentes às curvas de absorvância do centrifugado com a bactéria *E. coli* e a cor vermelho escuro para os pontos obtidos do Gráfico 10 referentes às curvas de absorvância com a bactéria *S. mutans*.

Desta forma, selecionou-se o comprimento de onda de 600 nm e fez-se a leitura de cada uma das absorvâncias para cada uma das 12 respectivas velocidades de rotação da centrífuga em que cada uma das amostras foram centrifugadas.

Assim, foi possível construir o Gráfico 11 e observar por esse método de análise que o comportamento das duas amostras tiveram praticamente o mesmo

desempenho quanto à relação inversa entre o aumento da velocidade de centrifugação e a diminuição de partículas no centrifugado.

Também foi possível obter do Gráfico 11 que entre as variações da velocidade de 800 rpm (100 x g) até 3000 rpm (1409 x g) as amostras apresentaram claramente dois regimes de comportamento. Um que decai linearmente de 800 rpm (100 x g) até 2400 rpm (902 x g) e o outro regime constante que vai de 2400 rpm (902 x g) até 3000 rpm (1409 x g).

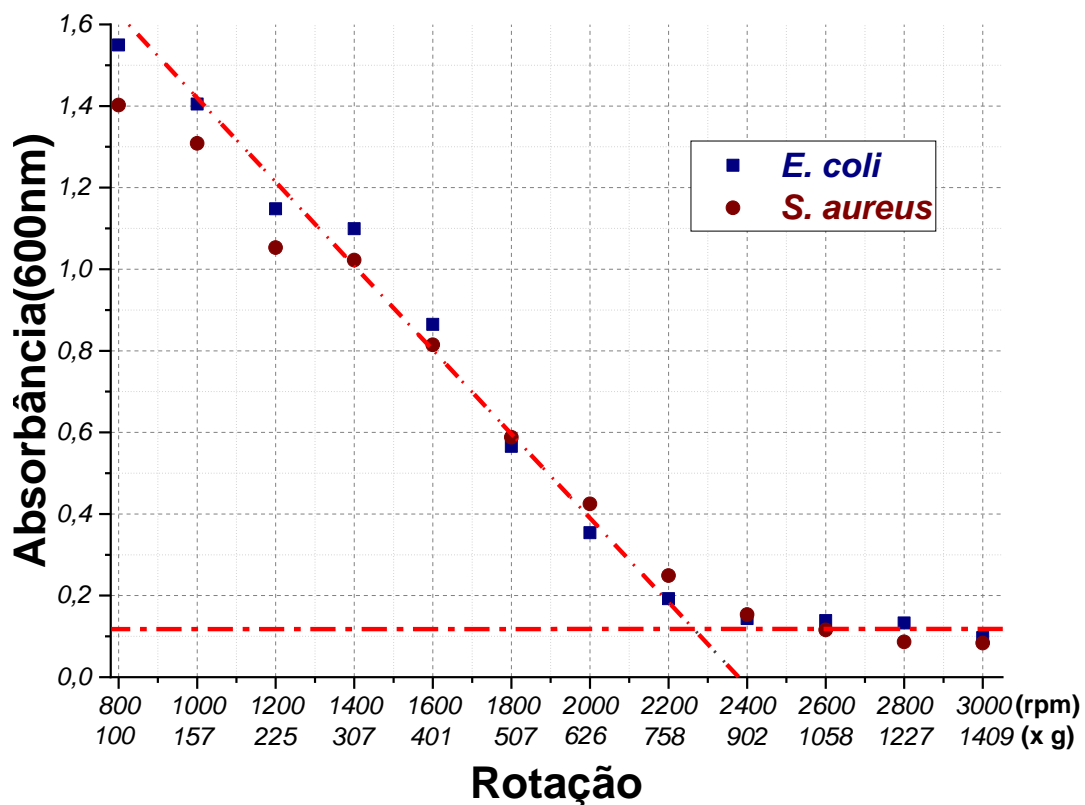


Gráfico 11 - Todos os pontos foram obtidos no espectro de absorbância na região espectral UV-Vis em 600 nm e os retirados do Gráfico 9, em azul sobrenadante da bactéria *E. coli*, e do Gráfico 10, em vermelho sobrenadante da bactéria *S. aureus*. Ao compará-los observa-se um comportamento similar para ambos organismos, de modo que a absorbância em 600 nm dos centrifugados deles seguem claramente dois regimes. Um que vai de decaindo praticamente linearmente de 800 rpm (100 x g) até 2400 rpm (902 x g). Outro de regime constante que vai de 2400 rpm (902 x g) até 3000 rpm (1409 x g). Evidencia-se no primeiro regime que conforme o centrifugado sofre o aumento da rotação da centrífuga a absorbância em 600 nm diminui, devido à diminuição de partículas no meio que são arrastadas para o fundo do tubo para a formação do *pellet*. Mas isso só ocorre até o limite de 2400 rpm (902 x g). A partir daí pode-se afirmar que a absorbância em 600 nm se mantém constante e próximo a 0,1. Note também que a centrifugação com a rotação em torno de 3000 rpm (1409 x g), nas condições deste experimento, sempre deixarão partículas no centrifugado que não serão arrastadas para o fundo do tubo e consequentemente não farão parte do *pellet*.

Fonte: Elaborado pelo autor

Com isso, duas observações foram evidenciadas, uma que após a centrifugação das amostras após a velocidade de 2400 rpm (902 x g), nas condições do experimento, não há significativamente variação da absorbância e que, como a absorbância não se anula, tem-se a existência no meio centrifugado medido o fato de que algumas células bacterianas não são centrifugadas e continuam em suspensão.

Mas como o objetivo maior deste trabalho é o de analisar a interação da curcumina com as bactérias, buscou-se estabelecer um protocolo seguro que garantisse a viabilidade celular.

Então, após a análise do Gráfico 11 e seus respectivos resultados adotou-se como protocolo para todos os demais experimentos a condição de velocidade de 3000 rpm (1409 x g).

Garantindo assim, com uma grande margem de segurança que todos os centrifugados serão adequadamente submetidos a uma força centrífuga para a formação do *pellet*, e este *pellet*, por sua vez, será de fácil diluição quando submetido ao vórtex de forma que os microrganismos estarão o mais disperso possíveis e que os danos bacterianos na superfície celular que afetam fenômenos sensíveis à superfície como interação e a internalização da curcumina estejam assegurados.

5.4 Curvas de crescimento característico das bactérias

O objetivo destes próximos três experimentos foi o de poder observar a viabilidade e o controle das informações adquiridas por meio das medidas ópticas de absorbância em cada uma das três cepas bacterianas.

Além das respectivas condições planctônicas em meio comercial próprio para cultura bacteriana do tipo *BHI*, acrônimo do inglês *Brain Heart Infusion*, e o acompanhamento do crescimento exponencial de cada uma delas, também buscou-se observar a interferência do meio de cultura nas medidas de absorbância uma vez que este vai mudando o seu turvor conforme os microrganismos vão crescendo.

Então, em comparação com as outras medidas que foram realizadas com as bactérias lavadas em *PBS*, que é um meio translúcido, buscou-se saber se estas medidas de absorbância em caldo manteriam o mesmo padrão das já realizadas,

sendo que todas as medidas de absorvância destes experimentos foram tomadas tendo como linha de base o próprio meio de cultura.

Para que o crescimento de cada uma das cepas não fosse afetado ao longo dos experimentos, cultivou-se inicialmente uma quantidade de 40 ml de caldo bacteriano que foram distribuídos em tubos do tipo *falcon* para cada uma das medidas. De modo que após as medidas de absorvância cada amostra utilizada fosse desprezada.

5.4.1 Curva de crescimento característico da *E. coli*

O acompanhamento do crescimento planctônico da bactéria *E. coli* foi realizado durante 6 h 30 min. Foram realizadas medidas de absorvância com as amostras em intervalos de tempo de 0 h, 1 h, 2 h e a partir daí de 30 em 30 min até que se completasse 6 h 30 min. Os resultados obtidos por todas as medições de todas as amostras foram compilados e formaram o Gráfico 12.

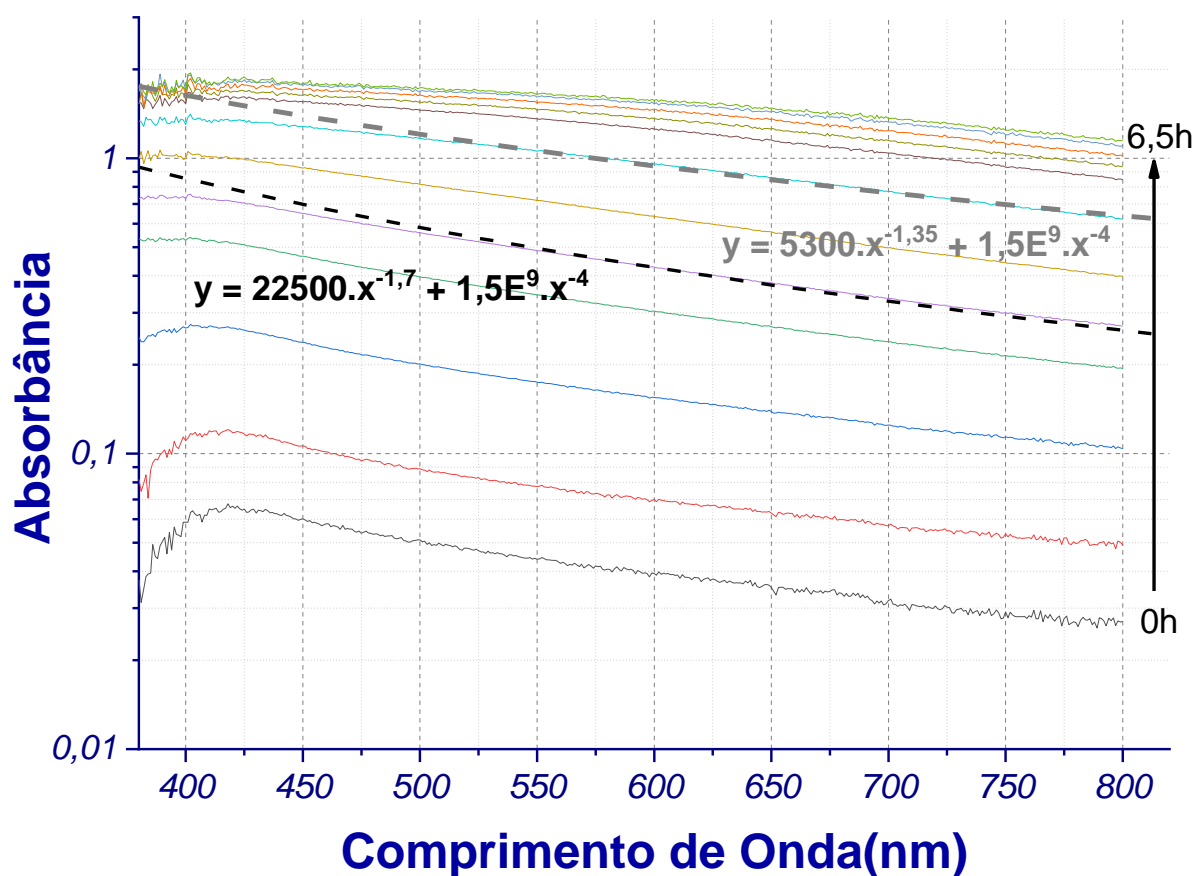


Gráfico 12 - Monologarítmo com a média de 12 medidas do espectro de Absorbância na região espectral UV-Vis de alíquotas de 2 ml de caldo bacteriano de *E. coli* em solução de *BHI*, com UFC inicial médio de $7,5 \times 10^6$ bactérias por mililitro de suspensão, em que cada medida foi obtida após o crescimento em estufa a $37,5 \text{ }^\circ\text{C}$ com agitação de 120 rpm. É possível identificar que a bactéria *E. coli* em solução de *BHI* apresenta a mesma uma curva apresentada no Gráfico 9, em solução salina, com espalhamentos característicos de partículas pequenas com os índices do λ variando de -1,7 até -1,35.

Fonte: Elaborado pelo autor

Neste Gráfico 12 é possível identificar que o crescimento das bactérias no caldo é acompanhado pela tendência de crescimento das curvas de absorbância ao longo do tempo. Note que os índices de espalhamento característico de λ variam de -1,7 até -1,35 conforme o aumenta-se a densidade do caldo.

Isso é observado na curva tracejada em preto com equação $y = 22\,500 \cdot x^{-1,7} + 1,5 E^9 \cdot x^{-4}$ que muda seu comportamento para a curva tracejada em cinza de equação $y = 5\,300 \cdot x^{-1,35} + 1,5 E^9 \cdot x^{-4}$.

Os fatores que provavelmente aparecem diretamente nestas medidas são os componentes e os restos da intensa atividade metabólica existente no meio. Além das diferentes formas de agregação das bactérias e das partículas no meio independente do movimento de agitação que os acompanha durante todo o experimento.

Com isso, retirando-se ponto a ponto de acordo com o horário de cada medida e na respectiva curva de absorvância no comprimento específico de onde de 600 nm, construiu-se o Gráfico 13 abaixo de forma que estabelecesse uma relação direta entre a absorvância e o tempo de cultura.

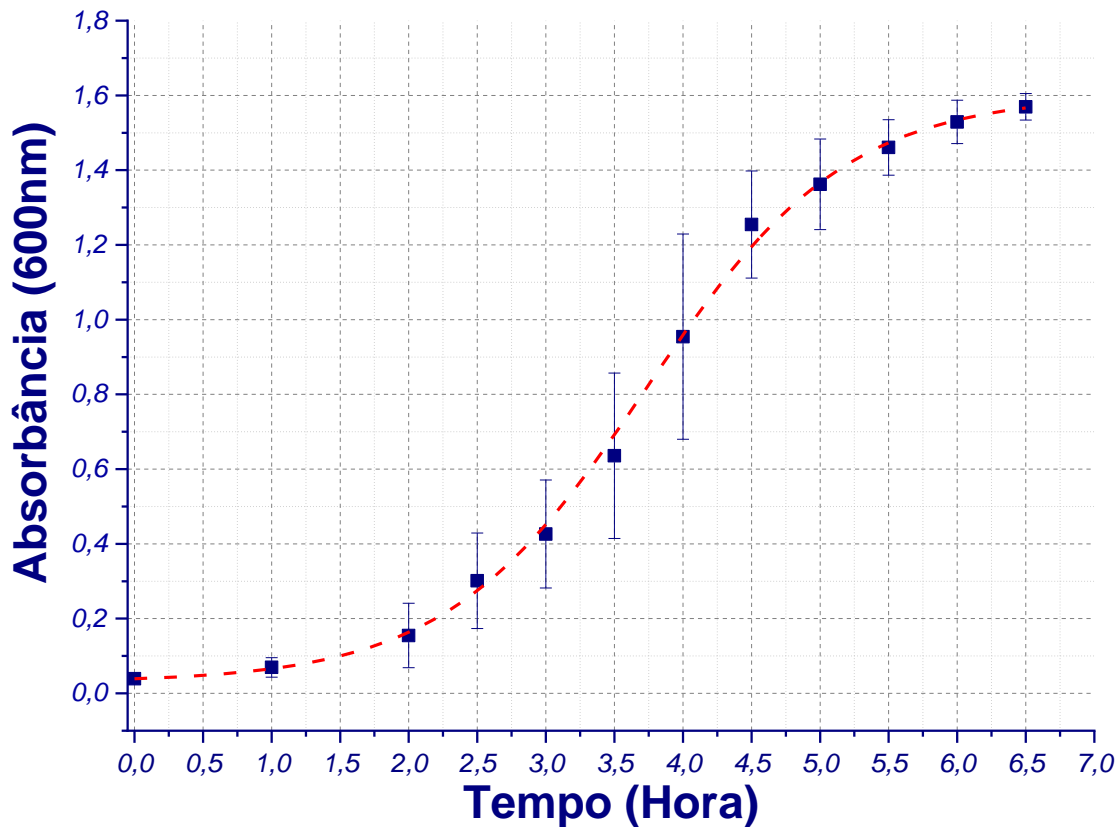


Gráfico 13 - Os pontos deste gráfico foram obtidos do espectro de absorvância na região espectral UV-Vis do Gráfico 12 traçando-se uma perpendicular no comprimento de onda de 600 nm e coletando-se para cada curva de absorvância o respectivo valor em cada tempo medido. No ajuste realizado para esta curva evidenciou o crescimento exponencial da bactéria *E. coli* e sua respectiva fase logarítmica de crescimento, confirmando assim por meio desta medida óptica a viabilidade da cepa utilizada e o método de crescimento adotado.

Fonte: Elaborado pelo autor

Ao elaborar este Gráfico 13 pode-se evidenciar a crescimento da bactéria *E. coli* na conhecida fase exponencial de crescimento apenas com as medidas de absorvância.

Pois, conforme as medidas de cada faixa temporal iam sendo realizadas, os resultados de absorvância iam aumentando proporcionalmente ao aumento de células no meio. Sabendo que o comportamento dos espalhamentos das medidas de absorvância observados no Gráfico 9 se mantinha no Gráfico 12 pode-se considerar

que este aumento entre as curvas era dado pelo aumento de partículas no meio, isto é, aumento do número de células bacterianas.

E considerando ainda, somente a fase exponencial entre as medidas de 2 horas e de 6 horas, foram obtidas 9 medidas. Assim, pode-se afirmar que a *E. coli* nessas condições tem uma nova geração em torno de 26 minutos, aumentando a sua massa e respectivamente o seu número de células.

Também foi possível inferir do Gráfico 13 que a cepa da *E. coli* escolhida para os experimentos de incorporação estava viável e em condições satisfatórias de viabilidade para as obtenções das medidas de absorvância dos experimentos com curcumina.

5.4.2 Curva de crescimento característico da *S. aureus*

O acompanhamento do crescimento da bactéria *S. aureus* ocorreu por um período de 5 h e 30 min. Os processos para as obtenções das medidas de absorvância aconteceram da mesma forma anteriormente descrita no subcapítulo anterior 5.4.1 Curva de crescimento característico da *E. coli*.

Desta forma, com o compilamento dos dados obtidos pelo espectrofotômetro referente às medidas de absorvância da cultura planctônica da bactéria *S. aureus* foi possível construir o Gráfico 14.

No Gráfico 14 é possível identificar pelo comportamento das curvas presentes que as formas planctônicas observadas no espectrofotômetro em *BHI* foram semelhantes às do Gráfico 10 com os índices de espalhamento característico λ de 1,7.

Desta forma, a que se considerar que mesmo os microrganismos estando em intensa atividade metabólica e em fase de crescimento, quando se realizam as medidas no espectrofotômetro das formas planctônicas tanto em *BHI* quanto em *PBS*, respeitando-se as linhas de base dessas medidas ópticas, pode-se assumir que as caracterizações ópticas medidas são tão próximas a ponto de apresentarem as mesmas características de espalhamento.

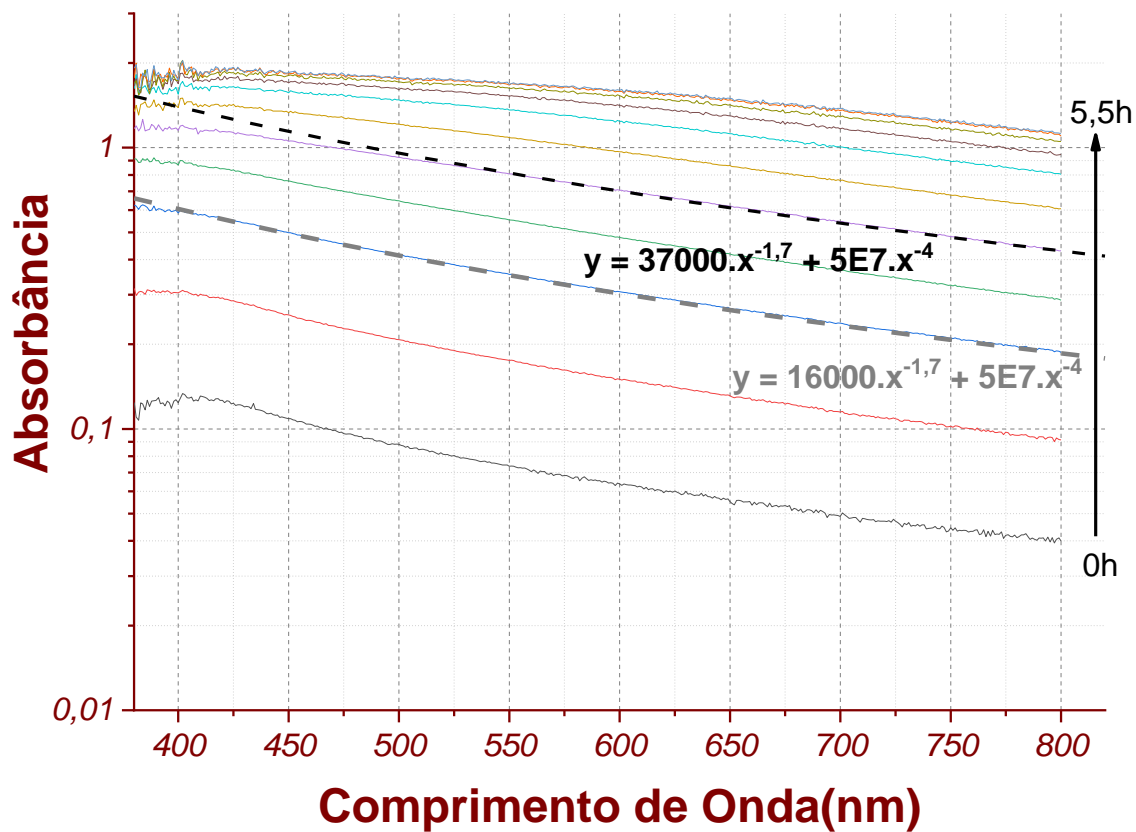


Gráfico 14 - Monologarítmo com a média de 11 medidas do espectro de absorvância na região espectral UV-Vis de alíquotas de 2 ml de caldo bacteriano de *S. aureus* em solução de *BHI*, com UFC inicial médio de $7,5 \times 10^6$ bactérias por mililitro de suspensão, em que cada medida foi obtida após o crescimento em estufa a $37,5 \text{ }^\circ\text{C}$ com agitação de 120 rpm. É possível identificar que a bactéria *S. aureus* em solução de *BHI* apresenta curvas semelhantes àquelas identificadas no Gráfico 10, em solução salina, com espalhamentos característicos de partículas pequenas com os índices do λ de -1,7.

Fonte: Elaborado pelo autor

Sendo assim, com o intuito de poder identificar o mesmo crescimento em fase de log, respondendo as questões sobre a viabilidade e a correspondente análise sobre as medidas ópticas adotadas, pegou-se para o comprimento de onda de 600 nm em cada curva do Gráfico 14 a medida de absorvância correspondente e construiu-se o Gráfico 15.

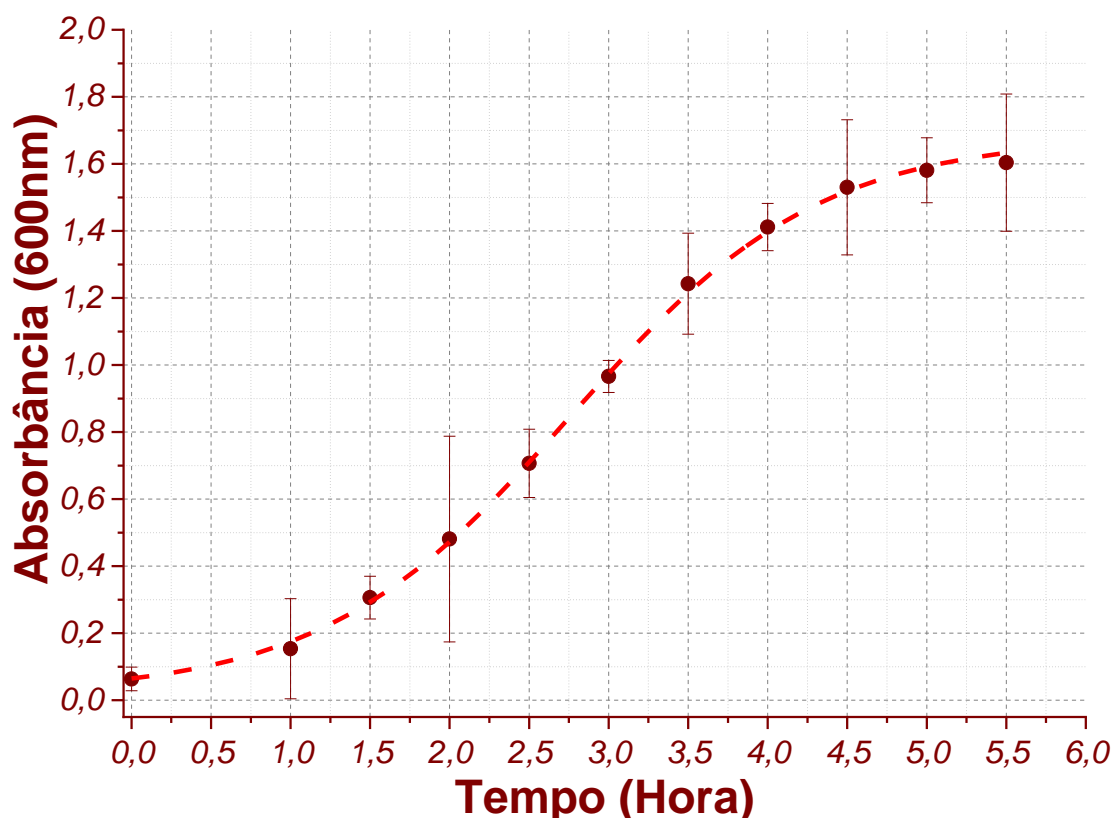


Gráfico 15 - Os pontos deste gráfico foram obtidos do espectro de absorbância na região espectral UV-Vis do Gráfico 14 traçando-se uma perpendicular no comprimento de onda de 600 nm e coletando-se para cada curva de absorbância o respectivo valor em cada tempo medido. No ajuste realizado para esta curva evidenciou-se o crescimento exponencial da bactéria *S. aureus* em sua respectiva fase logarítmica de crescimento, confirmando assim por meio destas medidas ópticas a viabilidade da cepa utilizada e o método de crescimento adotado.

Fonte: Elaborado pelo autor

Neste Gráfico 15 observou-se o mesmo comportamento característico de crescimento bacteriano apontado para a *E. coli* em sua fase exponencial. Temos que a bactéria *S. aureus* pode ser acompanhada apenas com medidas de absorbância de forma a se obter a sua viabilidade quanto ao crescimento.

Logicamente levando em consideração as mudanças obtidas no caldo quanto a sua coloração, o grau de turvor e após a primeira centrifugação a formação de um *pellet* característico desses microrganismos. Sendo assim, temos desse Gráfico 15 que entre as medidas de 1 hora e 4,5 horas, aproximação da fase exponencial de uma reta se plotada em um gráfico monologarítmico, que a *S. aureus* aumenta de tamanho cerca de 8 vezes, isto é, tem a sua massa total aumentada em 8 vezes, o que dá uma nova geração a cada 30 min.

5.4.3 Curva de crescimento característico da *S. mutans*

Após as análises realizadas anteriormente com as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, ao recebeu-se as amostras da bactéria *S. mutans*. Elas foram incorporadas neste estudo por meio de colaboração de uma associada ao projeto, em que buscou-se, além das realizações experimentais anteriormente descritas na subsecção anterior, também realizar a contagens de unidades formadoras de colônia para cada uma das medidas de absorvância realizadas.

Dessa forma, no primeiro experimento, para a caracterização da bactéria *S. mutans*, ela foi acompanhada ao longo de 18 horas com a realização de 27 medidas ópticas de absorvância e apenas 19 medidas contagem de unidades formadoras colônias durante as 11 horas iniciais. Os dados coletados com as medidas de absorvância são apresentados no Gráfico 16.

No Gráfico 16 é possível identificar, que conforme as medidas de absorvância foram sendo realizadas, o comportamento das curvas obtidas foi crescendo proporcionalmente ao crescimento bacteriano esperado para a *S. mutans*. Essa relação de crescimento também foi observada anteriormente para as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Além disso, também foi possível identificar que houve mudança no turvor do caldo bacteriano, fato indicativo de crescimento bacteriano.

Também nota-se, que as curvas de absorvância assumem um comportamento semelhante ao das bactérias anteriormente descritas, caracterizado pelo espalhamento de pequenas partículas em suspensão e com os índices de espalhamento λ variando de -4 até -1,5.

Temos que no início do experimento as curvas de absorvância apresentam equações próximas à descrita em cinza escuro, $y = 1700 \cdot x^{-1,7} + 1,5E^7 \cdot x^{-4}$. Conforme as bactérias vão crescendo as curvas passam por um regime de espalhamento com λ de -1,7 para -1,6 e tem suas equações próximas ao regime de $y = 1900 \cdot x^{-1,6} + 1,5E^7 \cdot x^{-4}$ e apresentadas pela cor vermelho escuro.

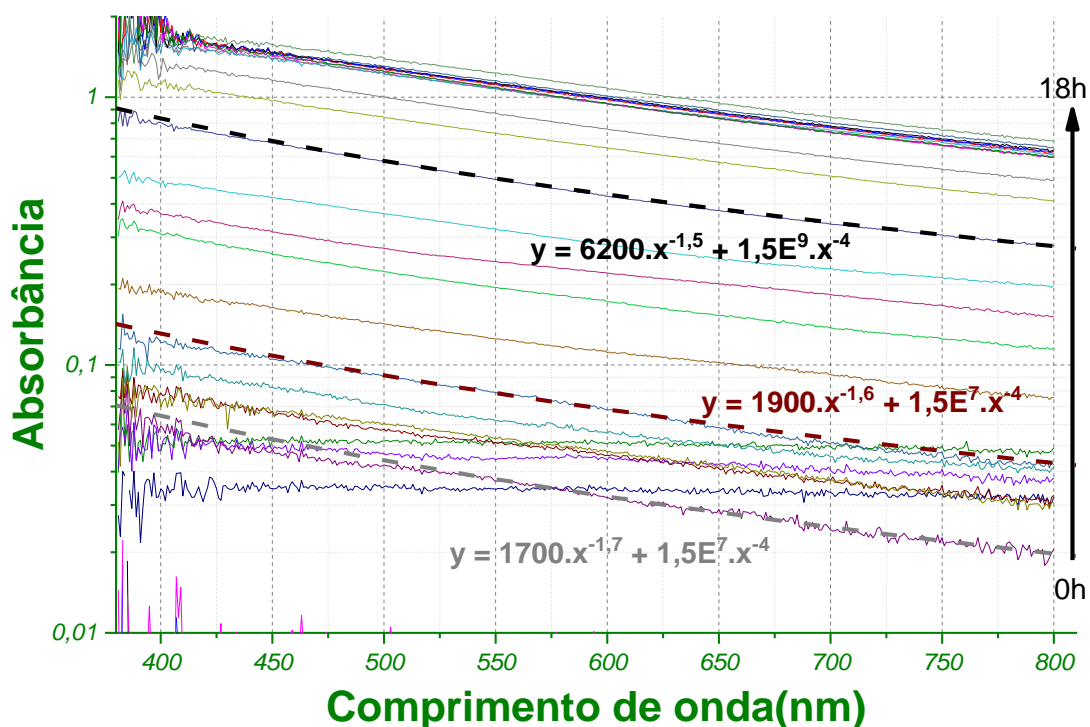


Gráfico 16 - Monologarítmico do espectro de Absorbância na região espectral UV-Vis com a média de 27 medidas de absorbância de alíquotas de 2 ml de caldo bacteriano de *S. mutans* em solução de *BHI* com 1% de glicose, com UFC inicial médio de $1,0 \times 10^6$ bactérias por mililitro de suspensão, em que cada medida foi obtida após o crescimento em estufa a $37,5 \text{ }^\circ\text{C}$ com agitação de 120 rpm. É possível identificar que conforme a bactéria *S. mutans* vai crescendo ao longo do tempo as curvas vão aumentando a absorbância medida em relação à curva anterior e que as últimas sete medições próximas às 18 horas mostram-se bem próximas devido ao aumento do espalhamento ocasionado pela intensidade do turvor do caldo bacteriano associado ao crescimento do microrganismo; O espalhamentos característicos de partículas pequenas é apresentado com os índices de espalhamento de λ variando de -4 e -1,5; Com isso tem-se que a equação característica apresentada para esse experimento tem no início a equação $y = 1700 \cdot x^{-1,7} + 1,5E^7 \cdot x^{-4}$, com λ de -1,7, passa para o regime com λ de -1,6, com equação de $y = 1900 \cdot x^{-1,6} + 1,5E^7 \cdot x^{-4}$ e estabiliza com λ de -1,5 e tendo uma equação de $y = 6200 \cdot x^{-1,5} + 1,5E^9 \cdot x^{-4}$.

Fonte: Elaborado pelo autor

Finalmente, após essa transição as curvas se estabilizam com λ de -1,5 e com as equações próximas a $y = 6200 \cdot x^{-1,5} + 1,5E^9 \cdot x^{-4}$, apresentadas em preto. A mudança de regime dos índices de espalhamento λ apresentados nas diferentes curvas do Gráfico 16 está associado ao crescimento da bactéria *S. mutans* em suas condições ideais e ao aumento do turvor do caldo bacteriano devido à intensa atividade metabólica e a grande quantidade de diferentes substâncias geradas neste meio, como a própria grande quantidade de bactérias crescendo exponencialmente.

Achou-se por bem que os dados da contagem das unidades formadoras de colônias por ml, que justificam as afirmações de crescimento do parágrafo anterior, e das medidas de absorvância em 600 nm de cada curva ao longo do tempo, fossem compilados num único gráfico afim de se obter uma forma direta de observação dos resultados. Assim, foi plotado o Gráfico 17.

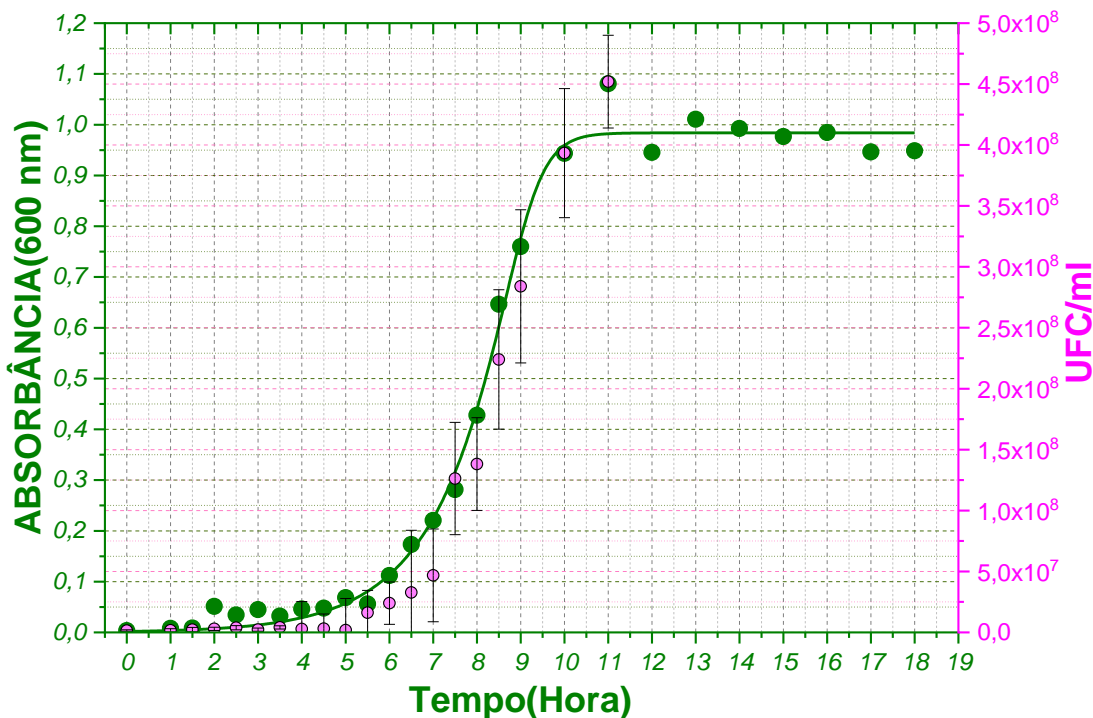


Gráfico 17 - Curva de crescimento da bactéria *S. mutans* construído a partir da união dos dados do Espectro de Absorbância na região espectral UV-Vis medidos no Gráfico 16 e que foram retiradas no comprimento de onda de 600 nm e dos resultados obtidos das contagens das UFC / ml. Satisfatoriamente é possível observar que o crescimento bacteriano apresentado tanto pelas medidas de absorvância quanto pelas UFC / ml seguem o mesmo regime de crescimento até as 11 horas medidas. Este resultado também confirma a viabilidade da bactéria *S. mutans* para o estudo e as condições adequadas de crescimento promovidas durante o experimento.

Fonte: Elaborado pelo autor

Neste Gráfico 17 pode-se observar que o mesmo comportamento de crescimento exponencial dos dois conjuntos de dados bacterianos anteriormente descritos, tanto para os dados obtidos das curvas obtidas do Gráfico 16 pelas medidas de absorvância em 600 nm quanto os dados obtidos pela contagem das UFC/ml. Temos que a maior medida de absorvância se dá as 11 horas juntamente com a última contagem de UFC/ml e que após esta medida todas as seguintes medições de absorvância estabelecerão uma constante próxima a 1 até o fim das 18hs. Isso deve

ter ocorrido devido ao aumento do turvor do caldo bacteriano ao longo do tempo devido ao crescimento dos microrganismos e ao aumento dos restos metabólicos associados a esse crescimento.

Sabendo das informações que são possíveis de se obter de um gráfico de crescimento bacteriano por meio dos valores de UFC / ml ao longo do tempo, afim de caracterizar a *S. mutans*, construiu-se o Gráfico 18 com as mesmas informações do Gráfico 17 plotando-se as informações dos eixos da Absorbância e do UFC / ml no Gráfico 18 monologarítimo.

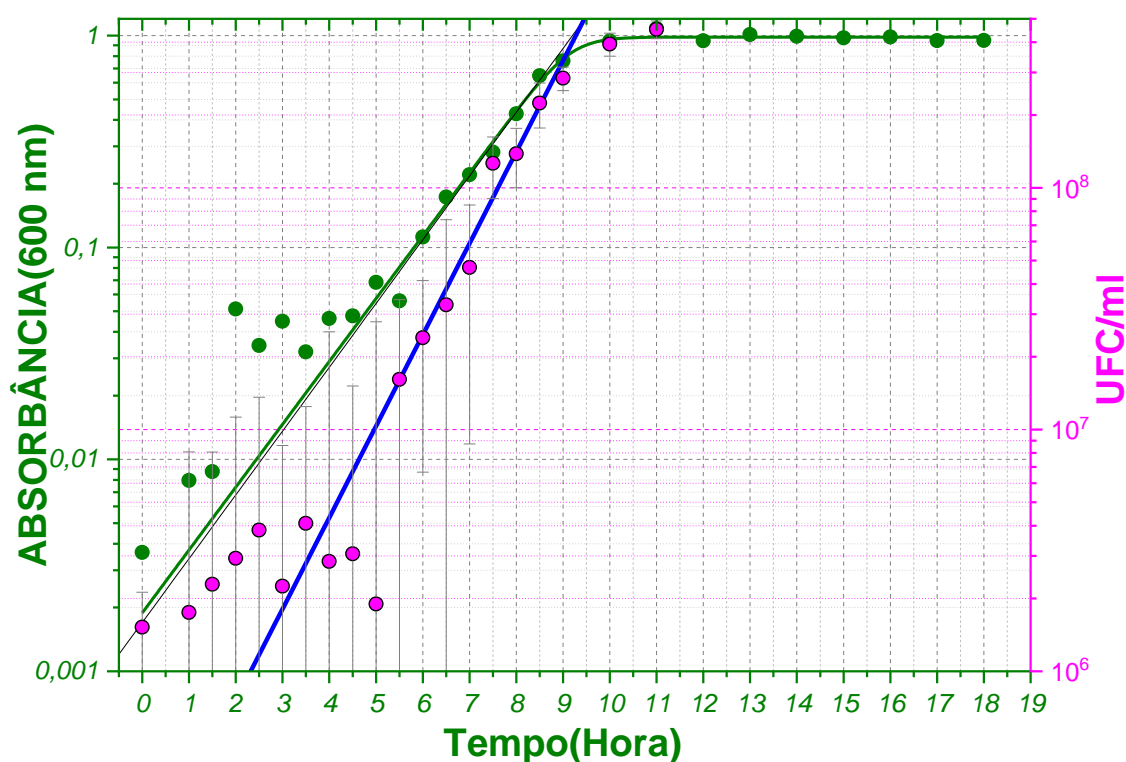


Gráfico 18 - Semilogarítimo obtido dos espectro de absorbância na região espectral UV-Vis do Gráfico 17. Para efeito de cálculos tomamos que a fase exponencial de crescimento da bactéria *S. mutans* está nos pontos da contagem de tempo entre 5,5 e 9 horas; Com isso, obtém-se todos os parâmetros possíveis de crescimento da bactéria *S. mutans* utilizada, como o número de gerações (n) de 1,02, o tempo de geração (g) de 0,98 h aproximadamente 1 h, a taxa de divisão (v) de 1,02 h⁻¹ e a taxa específica de crescimento (k) de 0,301 h⁻¹.

Fonte: Elaborado pelo autor

Ao construir-se o Gráfico 18, seguindo a fórmula em que o número de gerações (n) é $n = 3,3(\log N - \log N_0)$ e (N) é o UFC / ml médio final e (N_0) o UFC / ml médio inicial para pontos consecutivos da reta de crescimento exponencial de uma bactéria

em gráfico semilogarítimo, pode-se obter tomando-se os pontos as 5,5 horas e 6,5 horas que o n para este experimento foi de aproximadamente 1,02. Com isso, o tempo de geração (g), com $g = \frac{t}{n}$, t sendo a variação entre os tempos tomados, que o g foi de 0,98 hora, aproximadamente, 1 hora. A taxa de divisão (v), $v = \frac{1}{g} (h^{-1})$, foi de 1,02 h^{-1} e a taxa específica de crescimento (k), $k = \frac{0,301}{g}$, 0,307 h^{-1} .³⁵

Com isso, concluiu-se que para os próximos experimentos a bactéria *S. mutans* é plenamente viável ao estudo para os próximos experimentos e que as medidas ópticas de absorbância mostraram satisfatoriamente o crescimento bacteriano.

5.5 Quantificação das bactérias

Após as análises de caracterização das três bactérias em caldo, buscou-se a quantificação destas em solução salina, nas mesmas condições dos experimentos futuramente descritos com a introdução das curcuminas.

Neste subcapítulo iniciar-se- a utilização do recurso de Apêndices com o simples intento de tornar o texto o mais claro e objetivo, deixando-o mais limpo e com a apresentação dos gráficos conclusivos para os microrganismos *S. aureus* e *S. mutans*.

5.5.1 Quantificação da bactéria *E. coli*

Todos os experimentos foram elaborados de forma que após o pré-inóculo fosse respeitado o tempo de crescimento e a fase exponencial de cada microrganismo, para que então pudessem ser iniciadas as atividades.

Desta forma, retirou-se então uma alíquota de 12 ml deste caldo crescido e colocou-a em um novo tubo do tipo *Falcon* de 50 ml. Este, por sua vez, foi lavado três vezes em solução salina de *PBS*. Após a lavagem, retirou-se 4 alíquotas de 1,5 ml cada do *Falcon* e as distribuiu em 4 microtubos do tipo *ependorf*, totalizando 6 ml, e chamando-as de solução inicial, S_0 .

Em seguida, completou-se o *Falcon* com 6 ml de *PBS* de forma que ele voltasse a conter 12 ml de solução, mas que comparado à primeira, esta possuía uma diluição de 50 %. Isto é, utilizou-se deste processo para diluir S_0 pela metade, obtendo então a diluição S_1 .

Então, após a agitação no vórtex retirou-se novamente outros 6 ml, em 4 vezes seriais de 1,5 ml, e distribui-os em outros microtubos. Voltando-se novamente para o tubo *Falcon* inicial, repetiu-se o processo de acrescentar os 6 ml da solução salina e redistribuí-los nos *ependorfs* por 7 vezes sequenciais.

De tal forma, que ao fim das diluições obtivéssemos uma sequência de oito amostras, indo de S_0 , S_1 , S_2 , ..., até S_7 . Assim, as diluições sequenciais, de 6 em 6 ml representaram uma redução de 50 % de uma amostra para outra.

Sendo que a primeira, chamada de solução inicial, S_0 , contém 100 % da amostra bacteriana obtida do caldo lavado por três vezes, a segunda amostra, identificada por S_1 , com $\frac{1}{2}$ da S_0 , a terceira amostra, S_2 , com $\frac{1}{4}$ da S_0 , a quarta amostra, S_3 , com $\frac{1}{8}$ da S_0 , a quinta amostra, S_4 , com $\frac{1}{16}$ da S_0 , a sexta amostra, S_5 , com $\frac{1}{32}$ da S_0 , a sétima amostra, S_6 , com $\frac{1}{64}$ da S_0 , e por fim, a oitava amostra, S_7 , com $\frac{1}{128}$ da S_0 .

Desta maneira, por meio deste processo sequencial de diluições será possível, ao fim das construções gráficas, obter-se diretamente uma análise correlacionada entre o número de bactérias trabalhadas e o valor da absorbância medida para uma requerida diluição S , obtida do caldo bacteriano com o seu respectivo tempo de crescimento.

Após o preparo de todas as amostras diluídas de S_0 até S_7 , considerando um tempo médio de preparo de 7 minutos, fez-se a medida de absorbância de cada uma delas, tomando-se o cuidado de sempre agitar para que não houvesse distorção entre os resultados medidos.

Então, com os resultados da média das absorbâncias medidas de cada uma das quatro amostras em cada uma das diluições pode-se construir o Gráfico 19.

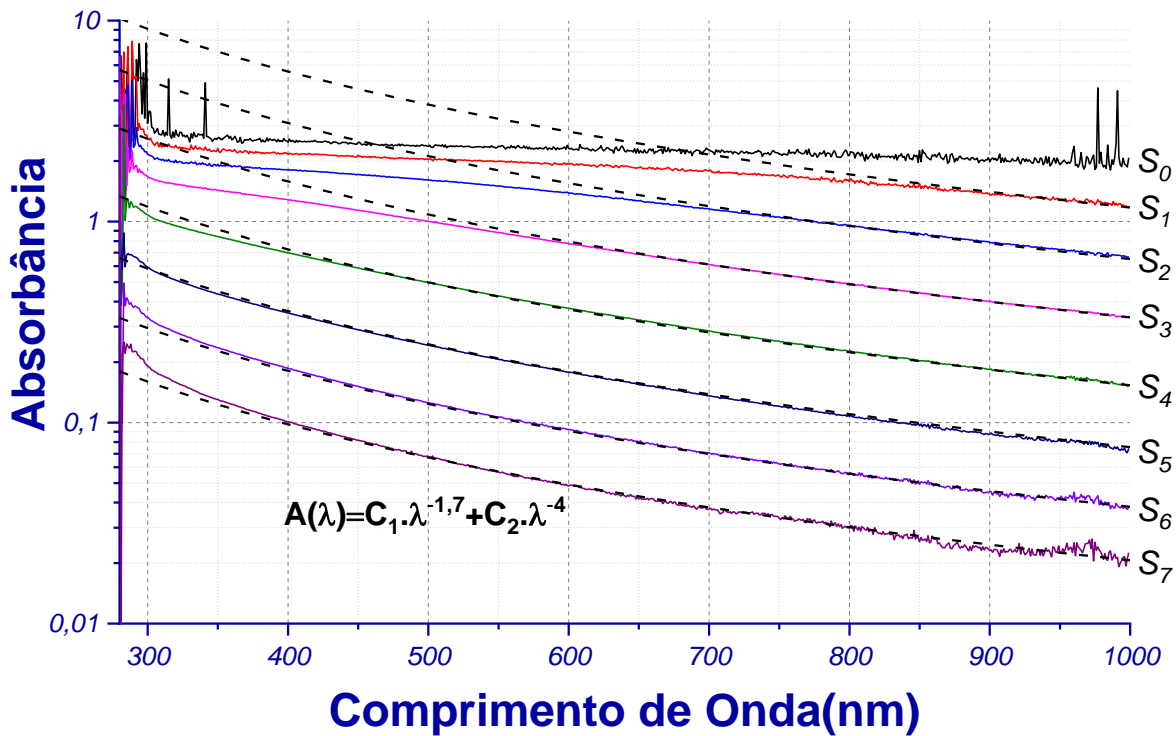


Gráfico 19 - Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das médias das medidas de absorvância do sobrenadante da *E. coli* submetido às diluições do tipo S. As curvas referentes às diluições seguem a equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$ apresentada para espalhamentos característicos de partículas pequenas com índices de λ de $-1,7$ e de -4 , como descrito na subseção 5.4.1. Notam-se que os comportamentos das curvas começam a homogeneizar-se em 600 nm, a partir da curva S_3 próximo à absorvância de 1, apresentando características semelhantes para menores comprimentos de onda. Observa-se que conforme a diluição do sobrenadante do caldo lavado aumenta a curva de absorvância diminui, uma característica já esperada, ao passo que quanto maior a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes na solução.

Fonte: Elaborado pelo autor

No Gráfico 19, é possível observar que a solução inicial S_0 medida com absorvância em torno de 2,5, que está bem concentrada, ao ser diluída pela metade passa para uma absorvância em torno de 2, em 600 nm, e para altos comprimentos de onda seu comportamento começa a assemelhar-se do esperado para a *E. coli*, quando comparado aos resultados medidos dos experimentos anteriores como o da seção Caracterização óptica das bactérias e o da subseção 5.4.1.

Conforme o processo de diluição, ou seja, diminuição da concentração em 50 % em relação à concentração anterior obtido pelo acréscimo da solução salina de PBS continua, verifica-se que as curvas vão baixando em relação à absorvância e em relação à curva anterior para as curvas S_1 , S_2 , até S_7 .

Característica já esperada devido à diminuição do número absoluto de bactérias no meio, que, se tratando em termos de partículas, com esse abaixamento padronizado do número de partículas no meio há também uma diminuição das medidas de absorvância para cada solução preparada de forma também padronizada que será melhor observada e discutido no Gráfico 20.

Observa-se também no Gráfico 19, que o comportamento das curvas segue a lei de formação de $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, conforme já descrito na subseção 5.4.1 para a *E. coli*, com os índices de espalhamento de λ de $-1,7$ e -4 característicos para o espalhamento de pequenas partículas.

Deste Gráfico 19 selecionou-se o comprimento de onda de 600 nm e para cada uma das médias obtidas para cada uma das diluições *S* e anotou-se as respectivas absorvâncias para cada curva. Com os resultados anotados, então foi possível plotar-se o Gráfico 20 juntamente com as informações colhidas das contagens das unidades formadoras de colônia por ml para cada quadrupla de diluição.

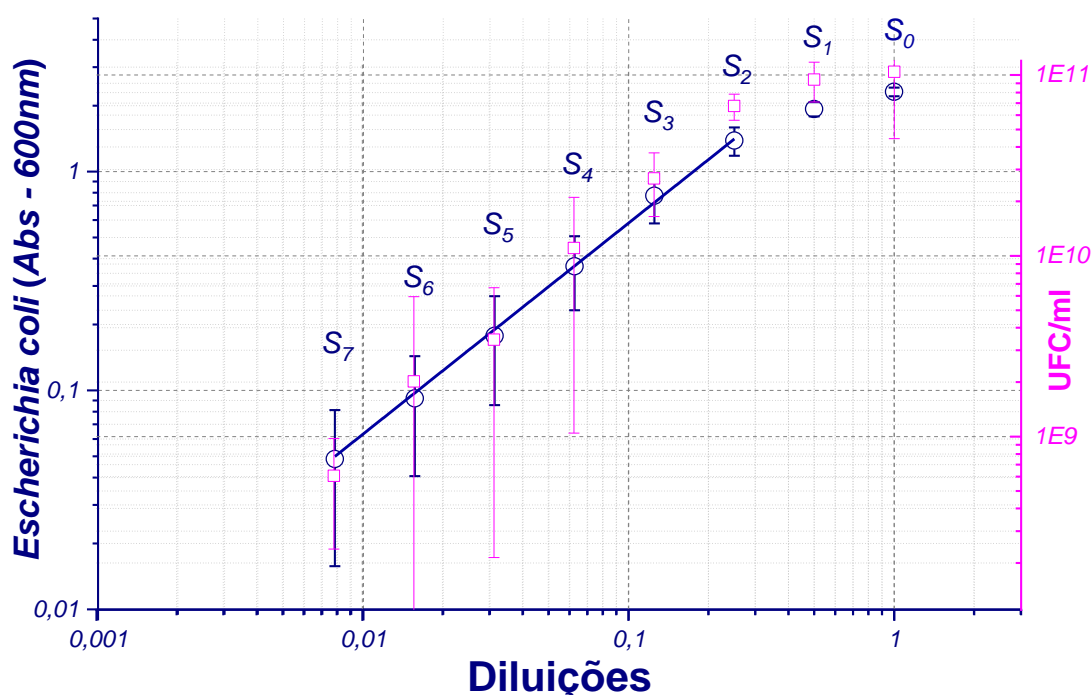


Gráfico 20 - Logarítmico obtido dos respectivos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis do Gráfico 19 retiradas no comprimento de onda de 600 nm para cada curva média de absorvância medida de cada diluição *S* e correlacionada às médias do *UFC médio/ml*. É possível estabelecer uma relação direta entre a média da quadrupla das absorvâncias de cada amostra *S* e seu *UFC médio/ml*. A linearidade apresentada entre as diluições *S*₂ e *S*₇ pelas medidas das médias das absorvâncias também é observada pelas contagens das unidades formadoras de colônias.

Fonte: Elaborado pelo autor

No Gráfico 20, ao construí-lo em eixos logarítmicos pode-se apresentar uma correlação direta e linear entre as medidas das médias de absorvância das quadruplas das amostras e suas respectivas médias de *UFC / ml* para as diluições de S_2 até S_7 . Desta forma, as amostras iniciais de S_0 e S_1 com as médias de absorvância em 2,5 e 2, respectivamente, não estão presentes na linearidade da reta em azul pela alta concentração de microrganismos presentes em suas amostras.

Então, de posse dessas informações e visando estabelecer uma relação direta entre as medidas de absorvância médias e as contagens médias das unidades formadoras de colônia por ml das amostras construiu-se o Gráfico 21.

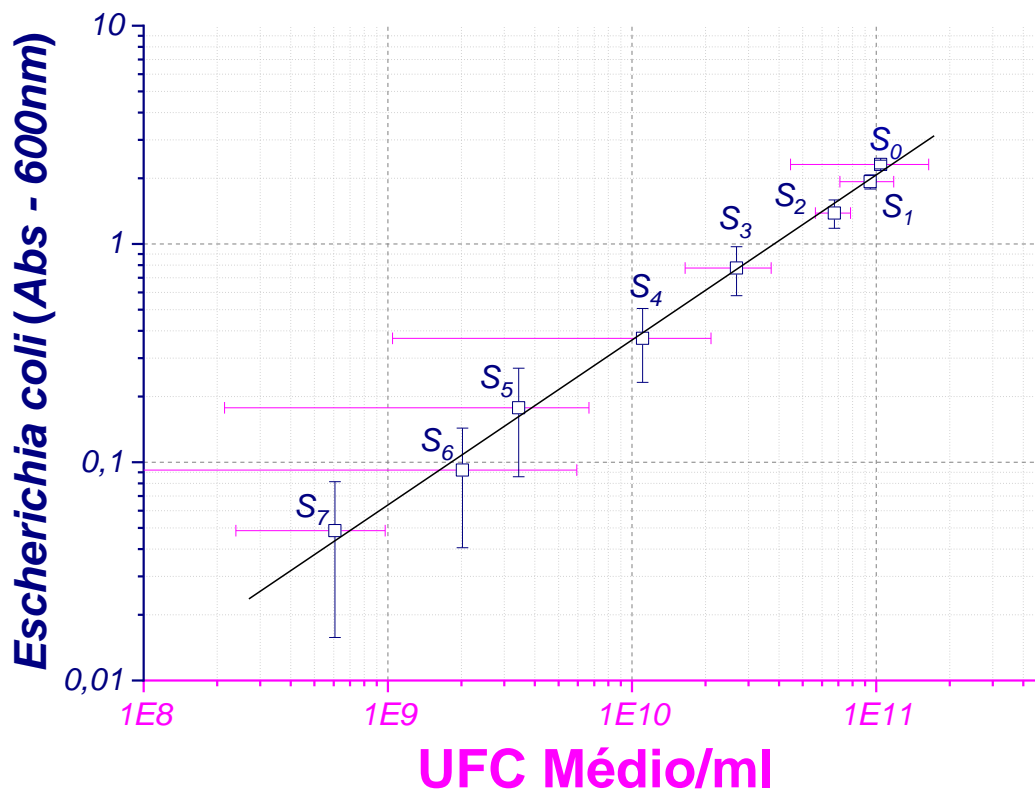


Gráfico 21 - Logaritmo que estabelece a relação direta entre as medidas médias das quadruplas de absorvância e o *UFC médio / ml* trabalhado com a bactéria *Escherichia coli*. Para construir este gráfico os dados foram retirados dos Gráfico 19 e Gráfico 20. Observa-se uma relação linear entre as médias das medidas de absorvância (Abs) em 600 nm e *UFC / ml*, estabelecendo assim uma forma indireta de contagem de células viáveis e a medida de absorvância para esta cepa. Assim, esse gráfico apresenta a seguinte correlação: S_0 com Abs de 2,31 e *UFC médio / ml* de $1,04 \times 10^{11}$, S_1 com Abs de 1,93 e *UFC médio / ml* de $9,44 \times 10^{10}$, S_2 com Abs de 1,39 e *UFC médio / ml* de $6,74 \times 10^{10}$, S_3 com Abs de 0,78 e *UFC médio / ml* de $2,68 \times 10^{10}$, S_4 com Abs de 0,37 e *UFC médio / ml* de $1,10 \times 10^{10}$, S_5 com Abs de 0,18 e *UFC médio / ml* de $3,44 \times 10^9$, S_6 com Abs de 0,09 e *UFC médio / ml* de $2,02 \times 10^9$ e S_7 com Abs de 0,05 e *UFC médio / ml* de $6,07 \times 10^8$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Neste Gráfico 21 pode-se estabelecer uma relação direta entre as medidas das médias das absorvâncias em 600 nm para cada diluição realizada e o *UFC médio / ml*. Assim, obteve-se a seguinte correlação para cada diluição S: S_0 com Abs de 2,31 e *UFC médio / ml* de $1,04 \times 10^{11}$, S_1 com Abs de 1,93 e *UFC médio / ml* de $9,44 \times 10^{10}$, S_2 com Abs de 1,39 e *UFC médio / ml* de $6,74 \times 10^{10}$, S_3 com Abs de 0,78 e *UFC médio / ml* de $2,68 \times 10^{10}$, S_4 com Abs de 0,37 e *UFC médio / ml* de $1,10 \times 10^{10}$, S_5 com Abs de 0,18 e *UFC médio / ml* de $3,44 \times 10^9$, S_6 com Abs de 0,09 e *UFC médio / ml* de $2,02 \times 10^9$ e S_7 com Abs de 0,05 e *UFC médio / ml* de $6,07 \times 10^8$.

5.5.2 Quantificação da bactéria *S. aureus*

Da mesma forma em que se fez a quantificação estabelecendo-se a relação direta entre as medidas das médias das absorvâncias em 600 nm e os *UFC médio / ml* da bactéria *E. coli* no subcapítulo anterior, 5.5.1 Quantificação da bactéria *E. coli*, fez-se para a bactéria *S. aureus*. Assim, de acordo com os gráficos obtidos e descritos no Gráficos das médias das absorvâncias das diluições sequenciais do tipo S da bactéria *S. aureus* foi possível a obtenção do Gráfico 22.

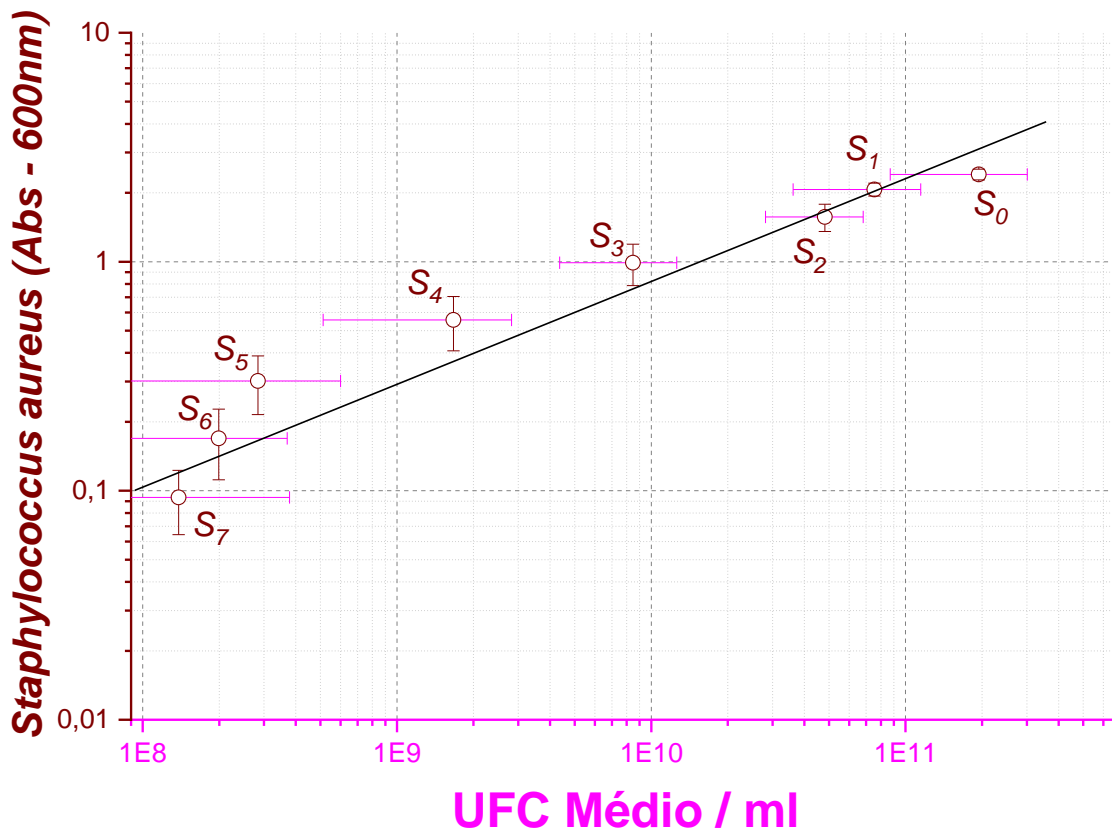


Gráfico 22 - Logaritmo que estabelece a relação direta entre as medidas médias das quadruplas de absorvância e a contagem média das unidades formadoras de colônias por ml (*UFC médio / ml*). Para construir este gráfico os dados foram retirados dos Gráfico 34 e Gráfico 35 do Gráficos das médias das absorvâncias das diluições sequenciais do tipo S da bactéria *S. aureus*. Nele, observa-se uma relação linear entre as médias das medidas de Absorvância (Abs) em 600 nm e *UFC / ml*, estabelecendo assim uma forma indireta de contagem de células viáveis e a medida de absorvância. Dessa forma esse gráfico apresenta a seguinte correlação: S₀ com Abs de 2,31 e *UFC médio / ml* de 1,04 × 10¹¹, S₁ com Abs de 1,93 e *UFC médio / ml* de 9,44 × 10¹⁰, S₂ com Abs de 1,39 e *UFC médio / ml* de 6,74 × 10¹⁰, S₃ com Abs de 0,78 e *UFC médio / ml* de 2,68 × 10¹⁰, S₄ com Abs de 0,37 e *UFC médio / ml* de 1,10 × 10¹⁰, S₅ com Abs de 0,18 e *UFC médio / ml* de 3,44 × 10⁹, S₆ com Abs de 0,09 e *UFC médio / ml* de 2,02 × 10⁹ e S₇ com Abs de 0,05 e *UFC médio / ml* de 6,07 × 10⁸.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Neste Gráfico 22 é possível a obtenção de uma relação linear direta entre as médias das absorvâncias, em 600 nm, e os *UFC médio / ml* para cada diluição S da seguinte forma: S₀ com Abs de 2,31 e *UFC médio / ml* de 1,04 × 10¹¹, S₁ com Abs de 1,93 e *UFC médio / ml* de 9,44 × 10¹⁰, S₂ com Abs de 1,39 e *UFC médio / ml* de 6,74 × 10¹⁰, S₃ com Abs de 0,78 e *UFC médio / ml* de 2,68 × 10¹⁰, S₄ com Abs de 0,37 e *UFC médio / ml* de 1,10 × 10¹⁰, S₅ com Abs de 0,18 e *UFC médio / ml* de 3,44 × 10⁹, S₆ com Abs de 0,09 e *UFC médio / ml* de 2,02 × 10⁹ e S₇ com Abs de 0,05 e *UFC médio / ml* de 6,07 × 10⁸.

5.5.3 Quantificação da bactéria *S. mutans*

Utilizando-se do mesmo método para a construção dos Gráfico 21 e Gráfico 22, respectivamente para as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, descritos para a obtenção da relações diretas entre as medidas das médias das absorbâncias e os *UFC médio / ml* retirou-se as informações dos Gráfico 36 e Gráfico 37 do Gráficos das absorbâncias das diluições sequenciais da bactéria *S. mutans* – para a construção do Gráfico 23.

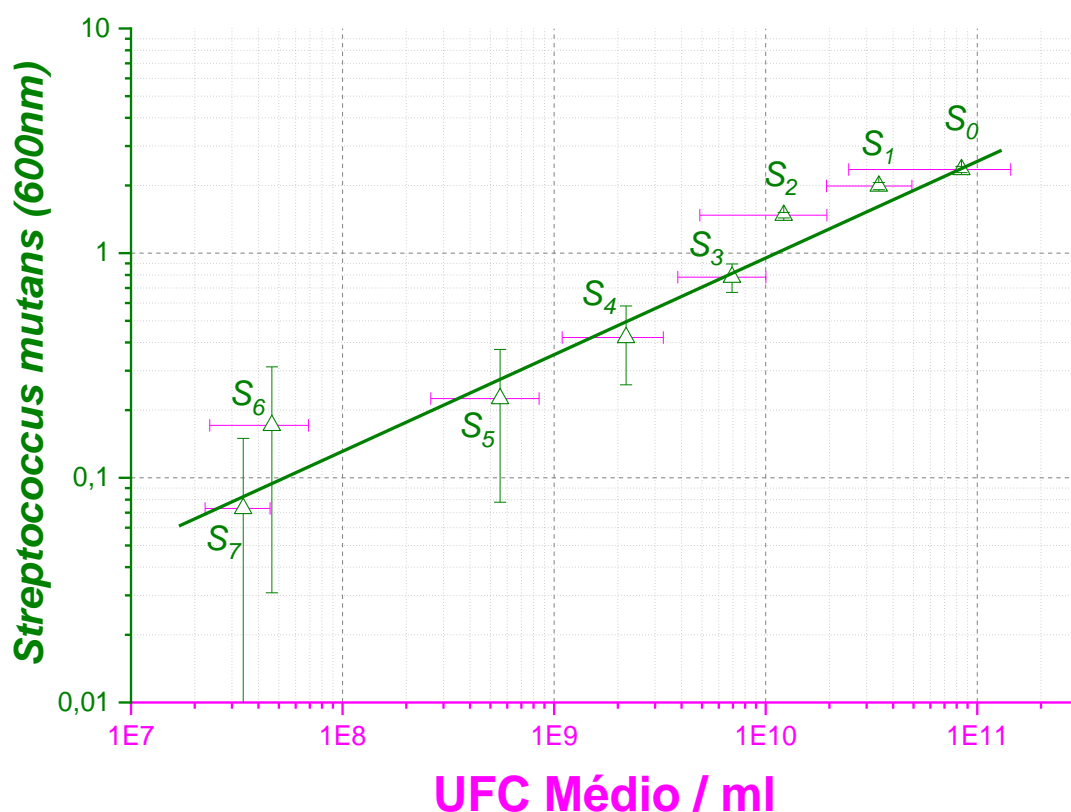


Gráfico 23 - Logaritmo que estabelece a relação direta entre as medidas médias das quadruplas de absorbância e a contagem média das unidades formadoras de colônias por ml (*UFC médio / ml*). Para construir este gráfico os dados foram retirados dos Gráfico 36 e Gráfico 37 do Gráficos das absorbâncias das diluições sequenciais da bactéria *S. mutans*. Nele, observa-se uma relação linear entre as médias das medidas de Absorbância (Abs) em 600 nm e *UFC / ml*, estabelecendo assim uma forma indireta de contagem de células viáveis e a medida de absorbância. Dessa forma esse gráfico apresenta a seguinte correlação: S₀ com Abs de 2,36 e *UFC médio / ml* de 8,43x10¹⁰, S₁ com Abs de 1,99 e *UFC médio / ml* de 3,43x10¹⁰, S₂ com Abs de 1,48 e *UFC médio / ml* de 1,22x10¹⁰, S₃ com Abs de 0,78 e *UFC médio / ml* de 6,93x10⁹, S₄ com Abs de 0,42 e *UFC médio / ml* de 2,19x10⁹, S₅ com Abs de 0,23 e *UFC médio / ml* de 5,55x10⁸, S₆ com Abs de 0,17 e *UFC médio / ml* de 4,63x10⁷ e S₇ com Abs de 0,07 e *UFC médio / ml* de 3,39x10⁷.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Neste Gráfico 23 é possível a visualização de uma relação linear entre as medidas das médias das absorbâncias, em 600 nm, e os *UFC médio / ml* para cada diluição S estabelecendo a seguinte relação direta: S_0 com Abs de 2,36 e *UFC médio / ml* de $8,43 \times 10^{10}$, S_1 com Abs de 1,99 e *UFC médio / ml* de $3,43 \times 10^{10}$, S_2 com Abs de 1,48 e *UFC médio / ml* de $1,22 \times 10^{10}$, S_3 com Abs de 0,78 e *UFC médio / ml* de $6,93 \times 10^9$, S_4 com Abs de 0,42 e *UFC médio / ml* de $2,19 \times 10^9$, S_5 com Abs de 0,23 e *UFC médio / ml* de $5,55 \times 10^8$, S_6 com Abs de 0,17 e *UFC médio / ml* de $4,63 \times 10^7$ e S_7 com Abs de 0,07 e *UFC médio / ml* de $3,39 \times 10^7$.

5.6 Interação entre as curcuminas e as bactérias

Após os sucessivos estudos e análises sobre as diferentes e referidas curcuminas e bactérias discutidas nas subsecções anteriores chegamos à motivação deste trabalho, o estudo da interação entre a curcumina e a bactéria.

Para a melhor compreensão desta última avaliação crítica da interação entre os diferentes tipos de curcuminas com as diferentes bactérias em solução salina, tomando-se objetivar de forma fundamentada e dinâmica as próximas análises, decidiu-se esmiuçar todos os repetitivos processos analíticos empregados em todas as possíveis combinações de interação curcumina-bactéria apresentadas até aqui, apenas para a interação entre a curcumina *Sigma* e a bactéria *E. coli*.

Com isso, todas as demais análises e tratamentos dos dados referentes a cada interação curcumina-bactéria estudadas estarão disponibilizadas como apêndices ao fim deste trabalho.

Vale lembrar ainda que para todos os experimentos a concentração da *stock solution* foi de 10 mg / ml e as alíquotas de curcumina utilizadas na interação foi de $3 \mu\text{l}$, sendo as concentrações finais das curcuminas no microtubo, de $1,5 \text{ ml}$, são de $55,1 \mu\text{M}$ para a curcumina Sigma, $57,4 \mu\text{M}$ para a curcumina Natural e de $54,3 \mu\text{M}$ para a curcumina Sintética.

Com isso, ao variar as “concentrações” das quantidades de bactérias nos microtubos por meio do processo apresentado como diluições sequenciais S e ao manter uma concentração de curcumina fixa, após o tempo de 5 minutos de interação curcumina-bactéria e 10 minutos de centrifugação, o que veremos nos resultados das

medidas de absorvância é a curcumina livre no sobrenadante e que não interagiu com as bactérias do meio. Dessa forma, pode-se observar as melhores interações curcumina-bactéria dentre as curcuminas Sigma, Natural e Sintética e as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *S. mutans*.

Além disso, vale ressaltar que todos os gráficos iniciais de absorvância apresentados na relação curcumina-bactéria foram compilados de todos os resultados obtidos por meio das triplicatas biológicas, adotando-se os valores médios de todas as curvas mostradas.

5.6.1 Interação entre a curcumina Sigma e a bactéria *E. coli*

Inicialmente, utilizou-se da técnica de diluições sequenciais S de bactérias, exposta no subcapítulo anterior, Quantificação das bactérias, tomando-se este processo para realizar a diluição do caldo bacteriano, crescido e lavado por três vezes em solução salina de *PBS*, da bactéria *E. coli*.

Então, utilizando-se das soluções *stock* preparadas na concentração de $10 \frac{mg}{ml}$ para a curcumina Sigma preparada em etanol, adotou-se como a solução de trabalho uma dose de $3 \mu l$ em cada um dos microtubos de $1,5 ml$ contendo o sobrenadante do caldo bacteriano lavado nas proporções das diluições do tipo S.

Assim, cada microtubo terá uma concentração de curcumina, neste tópico da Sigma, fixa de $55,1 \mu M$. Desta forma, após os 5 minutos de interação no escuro curcumina- bactéria e os 10 minutos de centrifugação mediu-se a absorvância do sobrenadante, sendo a alíquota medida de aproximadamente $1 ml$, em que esperava-se encontrar a curcumina livre e que não interagiu com a bactéria.

Com isso, foi possível estimar a quantidade de curcumina Sigma que estaria interagindo com a bactéria *E. coli* pois não apareceria na absorvância medida. Então, após a realização de todo o processo descrito na subsecção 4.5.4 Diluição do caldo bacteriano lavado e interação com curcumina, em triplicata biológica, foi possível a construção do Gráfico 24 após a realização dos cálculos das médias das medidas de absorvância para cada uma das diluições do tipo S apresentadas.

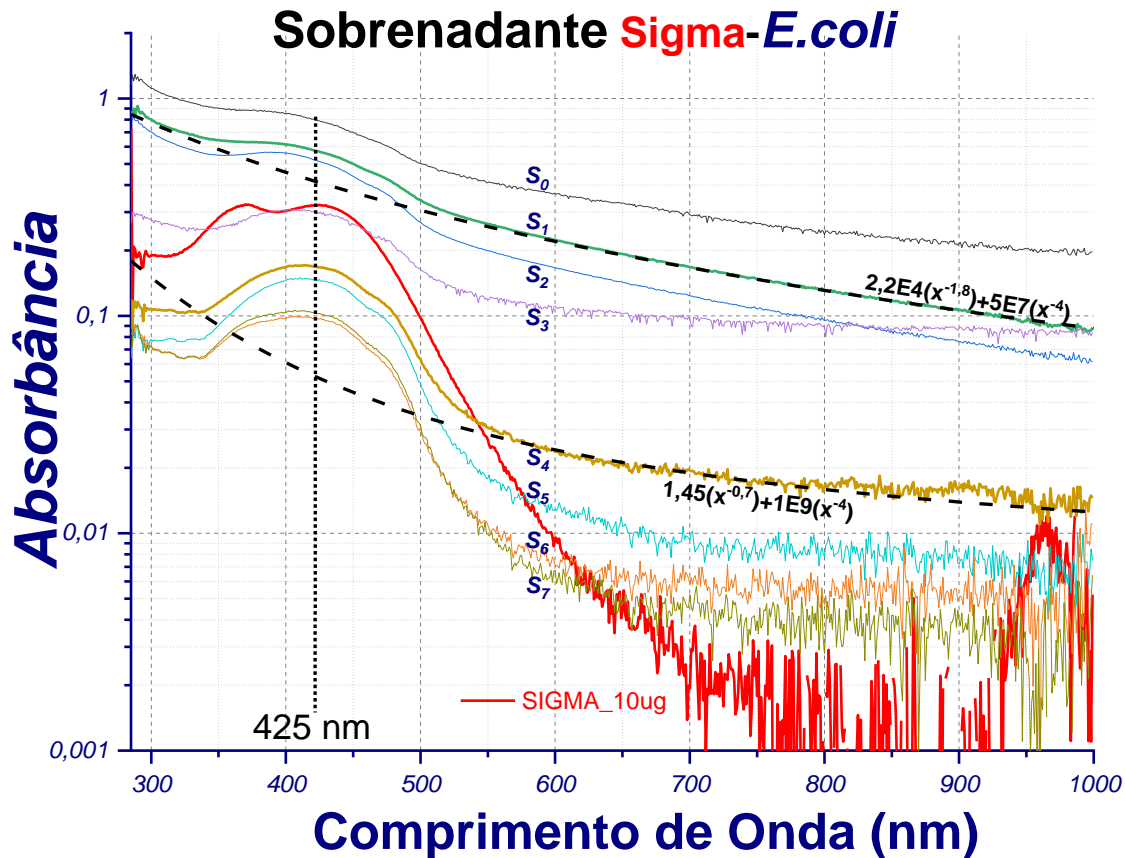


Gráfico 24 - Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das médias das triplicatas biológicas das diferentes diluições S referente às diferentes concentrações do sobrenadante do caldo bacteriano lavado da *E. coli*, com uma alíquota de $3 \mu\text{l}$, em cada uma das diluições S , retiradas das soluções stock de $10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ da curcumina Sigma preparada em solução de etanol, na concentração final de $55,1 \mu\text{M}$ por microtubo de $1,5 \text{ ml}$. Empreende-se inicialmente deste gráfico que todas as curvas médias apresentam os picos característicos da presença da curcumina Sigma no comprimento de onda de 425 nm , além disso, salienta-se dois diferentes regimes de curvas de absorvância ao considerarmos os espalhamentos para os comprimentos de onda entre 600 nm e 1000 nm . Um característico da bactéria *E. coli* para as curvas médias S_0 , S_1 e S_2 , que tem a lei de formação na equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, em que S_1 , por exemplo, apresenta a equação $A(\lambda) = 2,2 \times 10^4 \cdot \lambda^{-1,8} + 5,0 \times 10^7 \cdot \lambda^{-4}$ e com espalhamentos característicos de partículas pequenas e índices de λ de $-1,8$ e -4 . O outro regime com para as curvas médias S_3 , S_4 , S_5 , S_6 , e S_7 , com a lei de formação na equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-0,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, com, por exemplo, S_4 de equação $A(\lambda) = 1,45 \cdot \lambda^{-0,7} + 1,0 \times 10^9 \cdot \lambda^{-4}$ com espalhamentos que aproximam-se da curva média Sigma em PBS de equação $A(\lambda) = 0,2015 \cdot \lambda^{-0,3}$ e com espalhamentos característicos de partículas pequenas e índices de λ de $-0,7$ e -4 . Além disso, nota-se que conforme as concentrações do caldo bacteriano lavado vão diminuindo as curvas de absorvância também vão, uma vez que quanto maior for a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes no meio.

Fonte: Elaborado pelo autor

Inicialmente pode-se observar no Gráfico 24 que as curvas médias de absorvância para cada uma das diluições S vão diminuindo da mais concentrada, S_0 ,

para a mais diluída, S_7 , conforme já era esperado e foi discutido e observado no subcapítulo anterior, Quantificação das bactérias, uma vez que conforme há o aumento da diluição S menor se faz a presença de microrganismos no caldo bacteriano lavado.

Outra informação que nos salta aos olhos é a presença dos picos característicos da curcumina Sigma no comprimento do onda de 425 nm para todas as curvas médias de diluição S e dois diferentes regimes de curvas ao considerarmos os espalhamentos entre 600 nm e 1000 nm . Um para as três primeiras curvas de diluição, S_0 , S_1 e S_2 , com as equações da forma $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,8} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, tendo S_1 , por exemplo, a curva $A(\lambda) = 2,2 \times 10^4 \cdot \lambda^{-1,7} + 5 \times 10^7 \cdot \lambda^{-4}$, com os índices de espalhamento λ iguais a $-1,8$ e -4 , característicos para o espalhamento de pequenas partículas.

O outro regime que aparece para as outras curvas de absorvância, S_3 , S_4 , S_5 , S_6 e S_7 , apresenta a equação da forma $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-0,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, como, por exemplo, a curva S_4 com a equação $A(\lambda) = 1,45 \cdot \lambda^{-0,8} + 1 \times 10^9 \cdot \lambda^{-4}$, em que os índices de espalhamento λ são $-0,8$ e -4 , também característicos do espalhamento de pequenas partículas. Além disso, conforme essas últimas curvas vão tendo a quantidade de bactérias diminuídas, por conta do aumento da diluição do caldo em *PBS*, elas vão se aproximando da curva média do solução de trabalho da curcumina Sigma em *PBS* e da equação de espalhamento de $A(\lambda) = 2,015 \times 10^{-1} \cdot \lambda^{-0,3}$, a partir de 570 nm .

Então, conhecendo-se as curvas características de espalhamento tanto da bactéria *E. coli* quanto da curcumina Sigma e com a finalidade de estudar a interação curcumina-bactéria por meio da curcumina livre presente no sobrenadante, decidiu-se desprezar o *background*, o ruído de fundo, gerado pelas curvas das médias das diluições S a partir de $575,71 \text{ nm}$ e estudar a relação entre os picos de absorvância em 425 nm . Para isso, utilizando-se de uma das técnicas de análise de espectroscopia, em que se permitem uma análise espectral das curvas médias e suas inter-relações nos picos a serem estudados, buscou-se trabalhar por meio das absorvâncias relativas.⁸³

Para essa nova situação, traçou-se uma reta inclinada, curva de referência, passando pelo comprimento de onda de $575,71 \text{ nm}$, no Gráfico 24 monologarítimo e

transladou-se todas as curvas médias referentes às diluições S, de forma que ao fim do traslado os ruídos gerados a partir deste comprimento de onda fossem sobrepostos e pudessem ser desprezados pois, conforme foi discutido e analisado no subcapítulo 5.1 Caracterização óptica das curcuminas, o espalhamento gerado a partir desse comprimento de onda se deve à formação de *clusters* e aglomerados particulares, e que não são de interesse neste momento do estudo. Assim, restarão apenas o estudo da absorbância, de forma relativa agora, dos picos destas curvas médias das diluições S no comprimento de onda de 425 nm, obtendo-se o Gráfico 25.

Vale lembrar que a translação de uma função, $f(x)$, não modifica as características fundamentais de $f(x)$ pois nada mais é do que a adição de uma constante, c , à ela. Assim, se $c > 0$, c positivo, e for adicionado à $f(x)$ teremos uma nova função, y , que, relacionada a $f(x)$, terá a forma $y = f(x) + c$ e estará deslocada verticalmente para cima em relação à $f(x)$. Caso tenhamos um $c < 0$, isto é, c negativo, teremos um $y = f(x) - c$ que será deslocado verticalmente para baixo em relação à $f(x)$. Para os casos em que há o deslocamento na horizontal de y , para a esquerda ou direita, em relação à $f(x)$, basta adicionar a constante c , positiva ou negativa respectivamente, direto ao x . Tendo então $y = f(x + c)$ um deslocamento para a esquerda e $y = f(x - c)$ um deslocamento para a direita.⁸⁴

Dito isso, tem-se todas as funções de absorbâncias das médias das diluições S adicionadas da curcumina Sigma do Gráfico 25 transladadas apenas na vertical em relação às do Gráfico 24. Então, passa-se a trabalhar com as absorbâncias relativas e não mais absolutas, o quê permitir-se-a estabelecer relações entre as quantidades de curcumina livre, que não interagiram com a bactéria, relações entre as curvas de absorbância das médias das diluições S em que foram adicionadas a curcumina Sigma e as suas relações de interação curcumina-bactéria estudadas aqui neste subcapítulo como sendo Sigma-*E.coli*.

Nota-se num primeiro momento ao realizar o traslado das curvas médias das absorbâncias das diluições S adicionadas da curcumina Sigma, que houve uma inversão em relação ao ordenamento destas curvas do Gráfico 24 para o Gráfico 25. Enquanto que no Gráfico 24 as curvas apareciam, de cima para baixo, de S_0 para S_7 , no Gráfico 25, também de cima para baixo, elas posicionam-se de S_7 para S_0

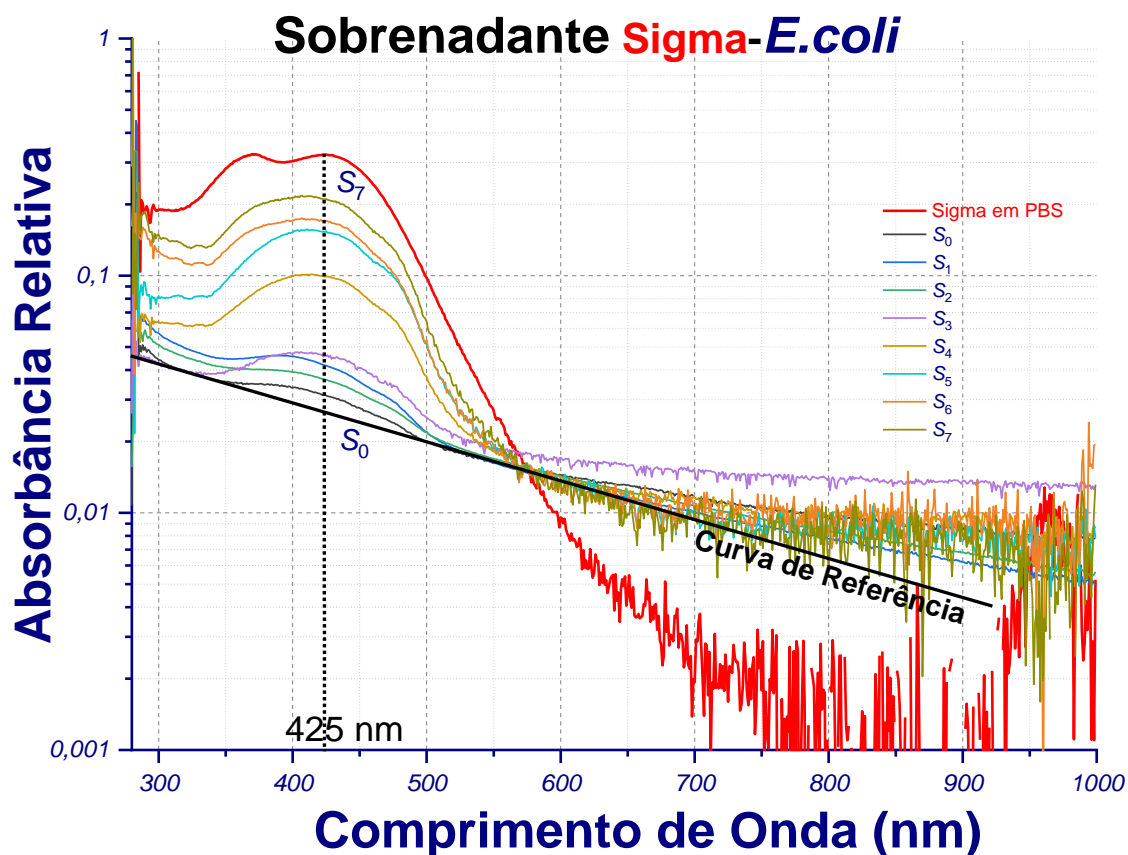


Gráfico 25- Monologarítmico dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das curvas médias transladadas em relação ao eixo y obtidas do Gráfico 24. Observa-se que ao realizar o translado das curvas, no comprimento de onda de $575,71 \text{ nm}$ e absorvância de $0,0323$, todas as curvas passam por este ponto específico permitindo-se com isso desprezar o ruído de fundo gerado a partir do comprimento de onda de $575,71 \text{ nm}$ para as futuras análises, por se tratar de uma região em que o espalhamento se deve à formação de *clusters* e aglomerados particulares como tratado no subcapítulo 5.1 Caracterização óptica das curcuminas. Além disso, tem-se que ao transladar essas curvas há uma inversão do posicionamento de cada uma delas em relação à originalmente traçada. Note que a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_0 que aparecia em primeiro, de cima para baixo, no Gráfico 24, agora aparece em último, sendo a mais próxima da curva de referência, e a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_7 que aparecia em último, de cima para baixo, no Gráfico 24, agora está em primeiro, ou seja, em relação à reta de referência esta é a mais distante.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Também infere-se do Gráfico 25, que há uma sobreposição das curvas médias de absorvância a partir do comprimento de onda de $575,71 \text{ nm}$ e que este espalhamento está associado à formação de *clusters* e aglomerados particulados que não foram arrastados pela centrifugação para o fundo do microtubo, conforme analisamos nos subcapítulos 5.1 Caracterização óptica das curcuminas e Caracterização óptica das bactérias. Dessa forma, buscando compreender melhor a interação Sigma-*E. coli*, o foco será nos picos das curvas médias das absorvâncias

das diluições S do caldo lavado da *E. coli* adicionada da curcumina Sigma no específico comprimento de onda de 425 nm .

Assim, para melhor interpretar esses dados construímos o Gráfico 26 colhendo as informações dos picos de cada medida média das absorvâncias relativas do Gráfico 25 no comprimento de onda de 425 nm em que foram subtraídos de cada uma destas curvas o valor da absorvância da curva de referência nesse comprimento de onda, que foi de 0,05119. Esse método conhecido como Morton-Stubbs, ou método da correção de três pontos, permitirá desprezar o ruído de fundo conhecido exibindo uma relação linear com o comprimento de onda além de garantir um valor confiável da absorvância para cada uma das amostras analisadas⁸³, pois vale lembrar que a quantidade de dados iniciais gerada é significativa, o que trás robustez nas análises, uma vez que todos os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas.

Dessa forma, para uma primeira análise da relação linear que será obtida do Gráfico 25 escolheu-se estabelecer uma correlação entre a absorvância relativa e a concentração do caldo lavado de bactérias em termos percentuais afim de que se pudesse observar as características fundamentais da nova curva gerada e isso possibilitasse um indício da compreensão dos caminhos adotados nesse tipo de análise. Então, usando as proporções das taxas de diluição S trabalhadas até aqui e transformando esses fatores em índices proporcionais da concentração do caldo bacteriano lavado da Sigma-*E.coli*, tomou-se a concentração inicial S_0 como sendo a de 100%, a de S_1 sendo de 50% de S_0 , S_2 sendo de 25% de S_0 , S_3 sendo de 12,5% de S_0 , S_4 sendo de 6,25% de S_0 , S_5 sendo de 3,125% de S_0 , S_6 sendo de 1,5625% de S_0 e S_7 sendo de 0,78125% de S_0 . Note que nesse momento os olhos estão focados na identificação do comportamento dos dados tratados pela abordagem escolhida e que por este motivo adotar-se-a trabalhar com as quantidade de bactérias em termos proporcionais de concentração e não com valores médios de contagem de colônias por ml como se faz correntemente na literatura.

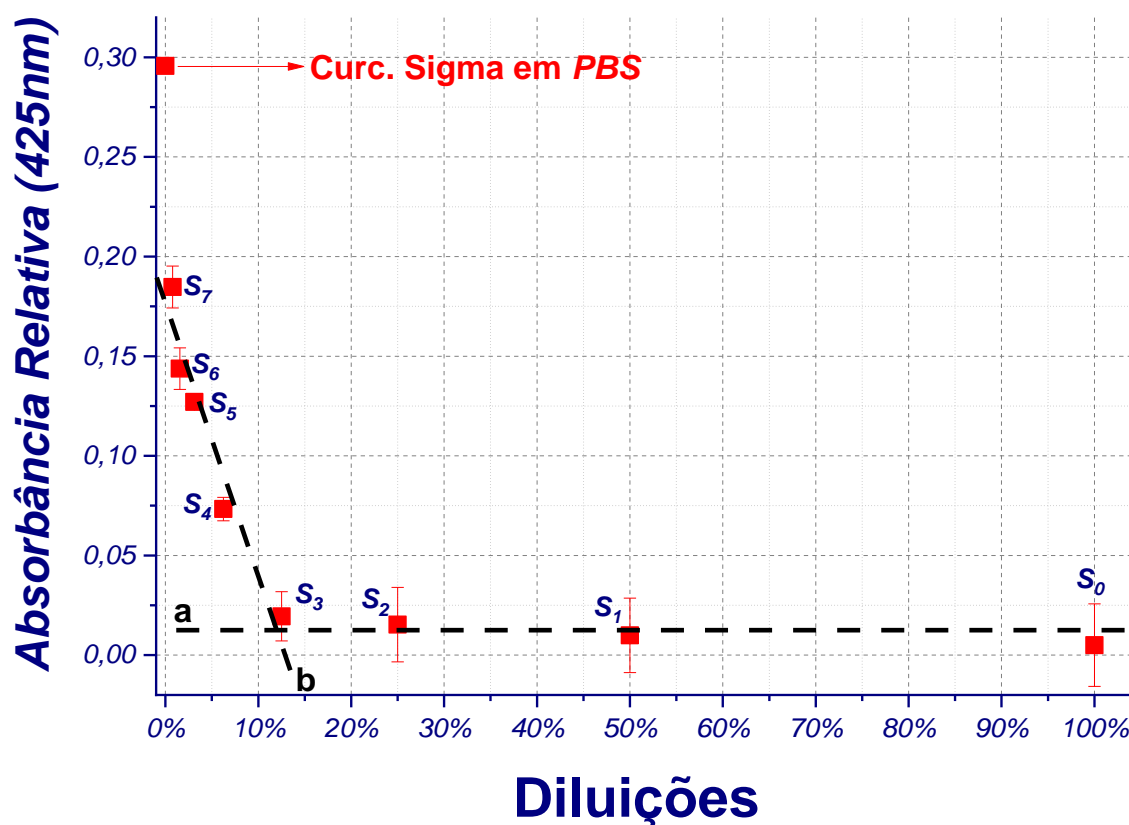


Gráfico 26 - Monologarímetro resultante da análise dos picos, no comprimento de onda de 425 nm, das curvas transladadas apresentadas no Gráfico 25. Observa-se dois regimes significativos em relação ao comportamento da quantidade de curcumina Sigma que interagiu com a *E. coli*, durante os 5 minutos de incorporação no escuro e os 10 minutos seguintes de centrifugação, que estão representados pelas retas tracejadas em preto. A curva (a) mostra um regime de acentuado de crescimento da absorbância relativa referente à curcumina livre no sobrenadante a partir da diluição S₃ e até a diluição S₇, uma situação que já era esperada na medida em que conforme há uma diminuição significativa das quantidades de bactérias no caldo lavado devido ao processo de diluição ocorre um aumento natural da concentração de curcumina Sigma que não interagiu com a *E. coli* devido essa diminuição de bactérias no caldo. A curva (b) apresenta uma pequena variação da quantidade de curcumina Sigma livre no meio, apresentada pela variação da absorbância de 0,02 até 0,04, entre as diluições S₀ e S₃. Isso ocorre devido à grande quantidade de bactérias no meio que acabam interagindo com a curcumina Sigma, restando então pouca curcumina livre no sobrenadante, fazendo com a absorbância pouco varie. A curva em vermelho representa o ajuste não linear da curva com as diluições de S₀ à S₇, e mostra de maneira natural como se dá o comportamento oposto da relação Sigma-*E.coli*. Conforme a concentração de curcumina-bactéria diminui a quantidade de curcumina livre no meio aumenta. E no ponto da curva de diluição S₃, tem-se o ponto de transição entre os regimes da concentração de bactérias no meio e a disponibilidade de curcumina livre.

Fonte: Elaborado pelo autor

Como o objetivo da construção deste gráfico foi de apoiar as análises norteando a escolha tomada, inferiu-se do Gráfico 26 diretamente pelo ajuste não linear, linha vermelha do gráfico, que a decisão analítica estava correta, pois por meio dela observa-se que conforme há uma diminuição percentual da quantidade de bactérias

que interagiram com a curcumina, proporcionada pelo aumento das diluições sequenciais S , nota-se que a absorvância relativa da curcumina livre no sobrenadante aumenta.

Além disso, evidencia-se dois diferentes regimes relacionando a concentração Sigma-*E.coli* com a absorvância relativa referente à curcumina livre que são as curvas tracejadas em preto desse Gráfico 26. A curva (a) nos mostra que da diluição S_3 até a diluição S_7 , enquanto ocorre uma pequena variação percentual na concentração Sigma-*E.coli*, de 12,5% para aproximadamente 0,8%, há um aumento significativo da absorvância relativa referente à curcumina livre no meio, de aproximadamente 0,04 para 0,4. Um aumento já esperado, mas não de forma acentuada para uma variação percentual pequena, uma vez que em todo o processo experimental há uma diminuição controlada com o fator $\frac{1}{2}$ de uma diluição S para outra. Já a curva (b) em que há uma grande variação percentual da concentração Sigma-*E.coli* da diluição S_0 de 100% para a diluição S_3 de 12,5%, a variação da absorvância relativa é pequena, de aproximadamente 0,02 até 0,04.

Um outro apontamento que se faz com respeito ao Gráfico 26, é que esses dois regimes representados pelas curvas tracejadas em preto (a) e (b) tem a sua transição no ponto próximo à diluição S_3 . Isso evidencia que à direita desse ponto, indo para as maiores concentrações Sigma-*E.coli* de S_2 para S_0 , em que a absorvância relativa da curcumina livre no sobrenadante é baixa, tem-se uma grande interação curcumina-bactéria. Já à esquerda, caminhando para as menores concentrações Sigma-*E.coli* de S_4 para S_7 , temos as menores interações curcumina-bactéria, uma vez que a absorvância relativa aumenta.

Então, transformou-se o Gráfico 26 em um gráfico em que fosse possível obter uma correspondência entre a concentração molar da curcumina Sigma livre no sobrenadante e o UFC médio / ml, gerando com isso o Gráfico 27. Para estabelecer essa correspondência de eixos, utilizou-se dos dados analisados contidos nos gráficos anteriores. Do Gráfico 1 (b) que relaciona a absorvância da curcumina com a concentração molar obtiveram-se as informações para o eixo das ordenadas. Para o eixo das abscissas, utilizando-se do Gráfico 19, do subcapítulo 5.5.1 Quantificação da bactéria *E. coli*, fez-se a leitura das absorvâncias médias no comprimento de onda de 425 nm e as adicionou no Gráfico 21 construindo-se o Gráfico 39, que encontra-se

no apêndice. Então, fez-se a leitura do Gráfico 38, que também encontra-se no apêndice, das medidas médias das absorvâncias no comprimento de onda de 425 *nm* dos caldos bacterianos lavados controles experimentais referentes às triplicatas biológicas da *E. coli* e que não tiveram a adição de nenhum tipo de curcumina. Em seguida, se fez a correlação dos dados obtidos na leitura dessas absorvâncias do Gráfico 38 com os do UFC médio / ml do Gráfico 39 na função correspondente ao comprimento de onda de 425 *nm*, obtendo-se, assim, as informações que deram origem ao eixo das abscissas do Gráfico 27.

Ressalta-se neste ponto, que no Gráfico 27 não serão utilizadas barras de erro, uma vez que ele foi construído a partir da leitura e análise de pontos e dados de outros gráficos utilizando-se para isso diretamente o *software* Origin®. Nele, utilizou-se a opção *Screen Reader* e nas curvas ampliadas dos gráficos fizeram-se as coletas de dados por meio das leituras dos pontos.

Dito isso, no Gráfico 27 observam-se dois regimes distintos com respeito ao comportamento das curvas ajustadas que são apresentadas por linhas tracejadas em preto. A curva (a) mostra que para as diluições de S_0 até S_3 há uma pequena variação da concentração molar da curcumina Sigma livre no sobrenadante que vai de aproximadamente, 1,12 μM , em S_0 , para 1,6 μM , em S_3 , representando uma variação de apenas 0,48 na concentração molar, em que tem-se na variação do UFC médio / ml uma variação de $1,055 \times 10^{10}$, saindo de $1,24 \times 10^{10}$ em S_0 para $1,85 \times 10^9$ em S_3 . Já o regime representado pela curva (b) do Gráfico 27, mostra que ocorre uma grande variação da concentração molar da curcumina Sigma livre no sobrenadante de, aproximadamente, 6,23 μM , indo de 1,6 μM em S_3 para 7,83 μM em S_7 , acompanhada por certa linearidade variação de 10^9 para 10^7 do UFC médio / ml que foi de $1,85 \times 10^9$ em S_3 para $5,55 \times 10^7$ em S_7 .

Com essa variação na concentração da curcumina livre no sobrenadante pode-se estimar que a eficiência da interação curcumina-bactéria aqui foi de, aproximadamente, 97%, considerando que foram desprezados em nossas análises o *background* gerado pelos *clusters* e aglomerados particulares que foram gerados ao colocar a solução de curcumina Sigma em solução salina de *PBS*.

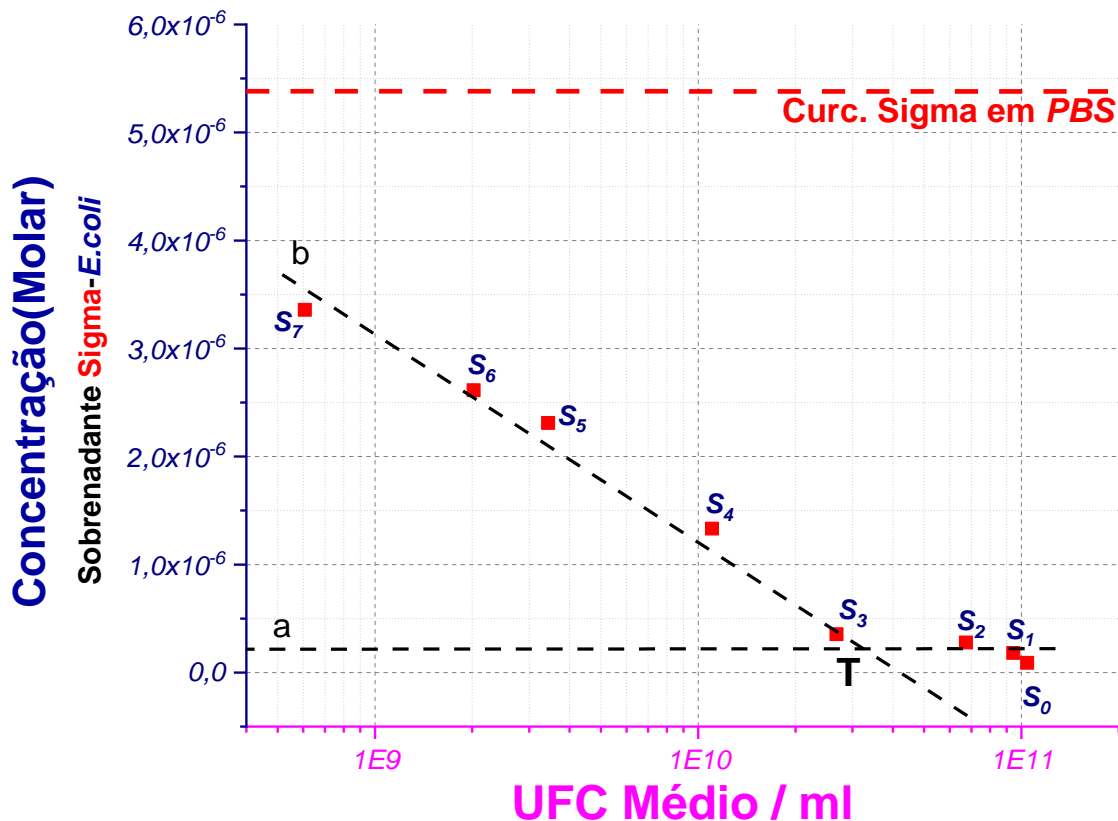


Gráfico 27 - Monologarítmico construído com as informações do Gráfico 26, para o eixo das ordenadas obtido pela correlação das absorvâncias relativas no comprimento de onda de 425 nm do sobrenadante contendo curcumina Sigma livre com a concentração molar do Gráfico 1-b, e o eixo das abscissas obtido pelas informações dos Gráfico 39, apêndice 0, e Gráfico 19 que correlacionados formaram o Gráfico 38, apêndice 0, em que se usou para fazer a leitura do caldo bacteriano de controle do experimento sem adição de curcumina e preparado pelo processo de diluições do tipo S. Evidenciam-se dois regimes para as diferentes concentrações molares de curcumina Sigma livre que estão representados pelas linhas tracejadas em preto. A curva (a) representa uma pequena variação da concentração molar da curcumina livre do sobrenadante de, aproximadamente, $1,12 \mu\text{M}$, S_0 , para $1,6 \mu\text{M}$, S_3 , em uma variação de UFC médio / ml de $1,24 \times 10^{10}$ para $1,85 \times 10^9$, respectivamente, de S_0 para S_3 . A curva (b) mostra uma grande variação da concentração molar da curcumina Sigma livre no sobrenadante de, aproximadamente, $1,6 \mu\text{M}$ em S_3 para $7,83 \mu\text{M}$ em S_7 , acompanhada por certa linearidade pela variação do UFC médio / ml de $1,85 \times 10^9$ em S_3 para $5,55 \times 10^7$ em S_7 . Com isso, pode-se afirmar que próximo ao ponto de diluição S_3 ocorre a transição dos diferentes regimes descritos tendo à direita de T uma pequena variação da concentração molar da curcumina Sigma livre que não interagiu com a grande concentração bacteriana entre 10^{10} e 10^{11} , e à esquerda uma maior variação da concentração de curcumina Sigma livre que não interagiu com a quantidade de bactérias que variou da ordem de 10^{10} para 10^8 .

Fonte: Elaborado pelo autor

Assim, interpreta-se graficamente que no ponto onde há intersecção das curvas (a) e (b), representado pelo ponto (T), ocorre a transição dos diferentes regimes de concentração descritos. Inferindo-nos, também, que a concentração bacteriana com

UFC médio / ml de, aproximadamente, $3,09 \times 10^9$, próximo à diluição S_3 , há um limite dessa interação curcumina-bactéria, pois como à direita desse ponto a concentração molar de curcumina livre praticamente se mantém e à esquerda tem-se uma acentuada variação dessa concentração molar de curcumina livre, pode-se interpretar que a partir desse ponto se a concentração bacteriana diminui tem-se um excesso de curcumina livre, isto é, a quantidade de curcumina usada para o experimento, de aproximadamente, $55,1 \mu M$, é suficiente e representa uma interação de 97% até um UFC / ml estimado de, aproximadamente, $3,09 \times 10^9$. Portanto, para uma concentração bacteriana menor começará a sobrar curcumina livre no meio.

Com isso, tomando-se os dados do subcapítulo Estabilidade da curcumina em meio aquoso, após o Gráfico 2, em tem -se a relação de 9% de curcumina Sigma livre e 91% de agregados em solução na concentração de, $27 \mu M$, e aproximando-se a relação Curcumina livre x Concentração molar para uma relação linear, alguns números interessantes podem ser estimados.

Sendo a concentração trabalhada de aproximadamente, $55,1 \mu M$ de curcumina Sigma com apenas 9% de curcumina livre, a concentração de curcumina livre será de aproximadamente $4,959 \mu M$. Como, do Gráfico 27 no ponto T tem-se a concentração estimada de curcumina livre no sobrenadante de, aproximadamente, $0,354 \mu M$, conclui-se que $4,605 \mu M$ de curcumina interagiu com, aproximadamente, $2,68 \times 10^{10}$ bactérias de *E.coli*.

Assim, a concentração de molar de curcumina por bactéria é da ordem de $0,172 fM$. Então, se for estimado a área média da *E. coli* como sendo da ordem de $4,11 \mu m^2$, e transformando a concentração molar de curcumina por bactéria em número de moléculas, obtendo-se, aproximadamente, $285.198 \text{ moléculas}$, obtém-se cerca de $69.391 \text{ moléculas} / \mu m^2$. E ainda, se considerar o volume médio da *E. coli* em torno de $0,65 \mu m^3$, ou $6,5 \times 10^{-16} \text{ litros}$, para a mesma quantidade de $285.198 \text{ moléculas}$, terão $4,39 \times 10^{20} \frac{\text{moléculas}}{\text{litro}}$ por célula bacteriana, o que dividindo pelo Número de Avogadro, será obtida uma concentração de curcumina de, aproximadamente, $0,73 \text{ mM}$ por bactéria. O que pode ser interpretada por uma altíssima concentração de partículas por bactéria.

5.6.2 Comparação entre as interações curcumina-bactéria para as curcuminas Sigma, Natural e Sintética com a bactéria *E. coli*

Repetindo então o mesmo processo analítico descrito no subcapítulo anterior, 5.6.1 Interação entre a curcumina Sigma e a bactéria *E. coli*, bem como a geração dos gráficos nele contidos, trabalhou-se com as demais curcuminas estudadas, a curcumina Natural e a curcumina Sintética, interagindo com a bactéria *E. coli*. Então, de posse de todos esses novos resultados elaborou-se a construção do Gráfico 28.

Nele, foram colocadas simultaneamente as informações obtidas pelas interações Sigma-*E.coli*, Natural-*E.coli* e Sintética-*E.coli* e que estão contidas, respectivamente, nos gráficos: Gráfico 27, no Gráfico 43 e no Gráfico 47, sendo que os dois últimos estão nos respectivos apêndices 0 e 0 deste trabalho. Dessa forma, estabeleceu-se uma comparação entre as interações das referidas curcuminas com a *E. coli*.

Antes de analisar o Gráfico 28 em si, vale lembrar que como as curcuminas utilizadas apresentam pesos moleculares diferentes, conforme descrito no subcapítulo **As curcuminas utilizadas**, e a solução de trabalho foi de $3 \mu\text{l}$ em um volume de $1,5 \text{ ml}$ as concentrações molares das curcuminas serão de, aproximadamente, $55,1 \mu\text{M}$, $57,4 \mu\text{M}$ e de $54,3 \mu\text{M}$, respectivamente, para as curcuminas Sigma, Natural e Sintética.

Considerando os 9% da concentração total de curcuminas livres em solução, as concentrações molares estimadas de curcuminas livres serão da ordem de, aproximadamente, $4,959 \mu\text{M}$ para a Sigma, $5,2 \mu\text{M}$ para a Natural e $4,9 \mu\text{M}$ para a Sintética.

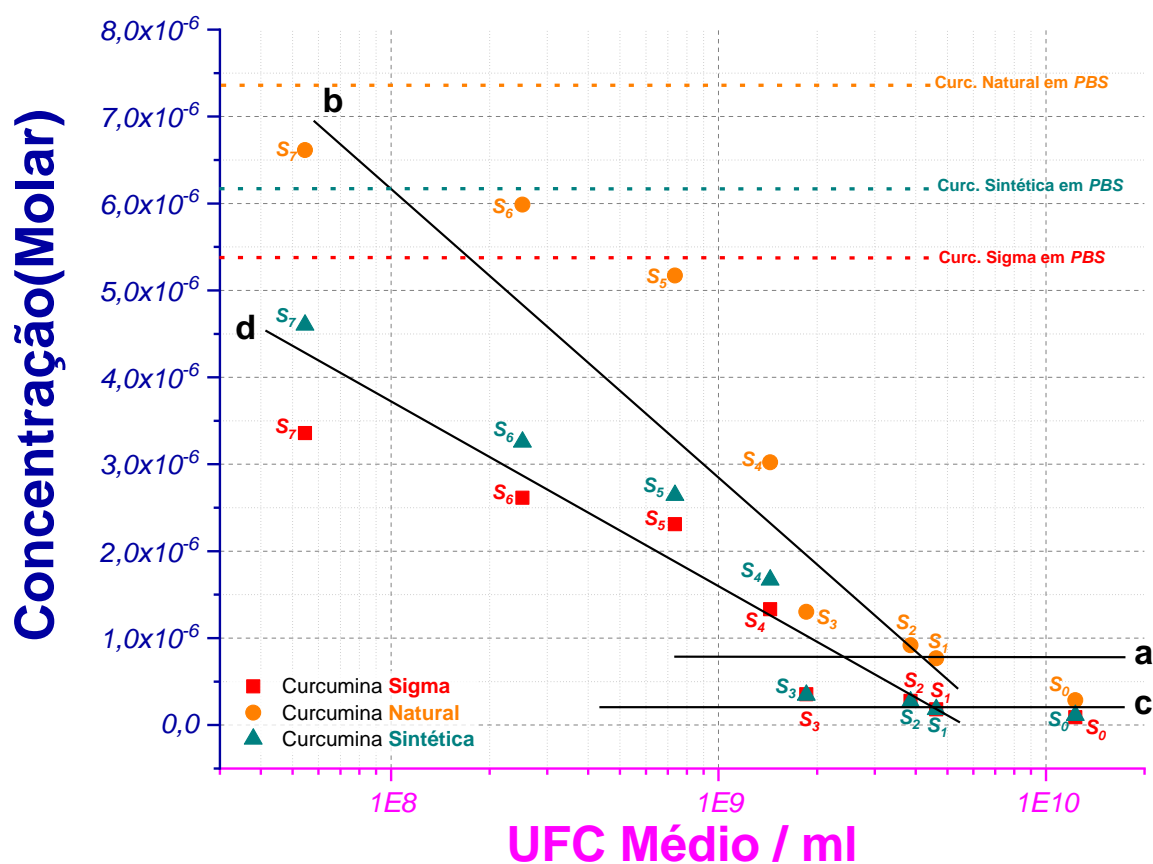


Gráfico 28 - Monologarítmo da concentração molar relativa das diferentes soluções de curcumina, Sigma, Natural e Sintética no sobrenadante do caldo lavado da *E. coli* das diluições S pelo relativo UFC médio / ml. Este gráfico foi obtido pela composição da leitura e análise dos gráficos: Gráfico 27, Gráfico 43 e Gráfico 47. Comparando a interação das três curcuminas com a bactéria *E. coli* observamos notadamente que a melhor interação que ocorreu foi a da Sigma-*E. coli*, uma vez que esta apresenta a menor concentração molar de curcumina livre no sobrenadante, curva *d*, dando o indício de que em todas as etapas do processo de diluições S ocorreram interações significativas de curcumina-bactéria, tendo comportamento semelhante para a Sintética-*E. coli*. Já a curcumina Natural, curvas *a* e *b*, apresentou uma menor interação com a *E. coli*.

Fonte: Elaborado pelo autor

Analisando então o Gráfico 28, nota-se claramente o comportamento semelhante das curcuminas Sigma e Sintética e diferente da curcumina Natural em relação as interações bacterianas. A maior interação estimada foi a da Sigma-*E. coli* enquanto a menor foi a da Natural-*E. coli*.

5.6.3 Comparação entre as interações curcumina-bactéria para as curcuminas Sigma, Natural e Sintética com a bactéria *S. aureus*

Tomando-se os mesmos processos de análise dos subcapítulos anteriores, 5.6.1 Interação entre a curcumina Sigma e a bactéria *E. coli* e 5.6.2 Comparação entre as interações curcumina-bactéria para as curcuminas Sigma, Natural e Sintética com a bactéria *E. coli*, substituindo-se a bactéria *E. coli* pela bactéria *S. aureus* e mantendo as três curcuminas utilizadas, Sigma, Natural e Sintética, nas mesmas concentrações molares, tanto a solução de trabalho quanto a *stock*, procederam-se as análises para os estudos das interações Sigma-*S.aureus*, Natural-*S.aureus* e Sintética-*S.aureus*.

Assim, foram construídos, analisados e interpretados os mesmos gráficos referentes às análises das interações curcumina-*E.coli*. Estes referidos gráficos estão contidos nos apêndices que vão do apêndice 0, Gráfico das correspondências estabelecidas entre as absorbâncias médias do sobrenadante dos caldos lavados da *S. aureus* nos comprimentos de onda de 425 nm e 600 nm e o UFC médio / ml referente às diluições do tipo S, ao 0, Gráfico relativo da Concentração molar da curcumina Sintética livre no sobrenadante dos picos em 425 nm das curvas transladadas das absorbâncias médias do caldo lavado da *S. aureus* referente às triplicatas biológicas das diluições S pelo relativo UFC médio / ml.

Com isso, dos resultados obtidos na construção dos gráficos Gráfico 53, Gráfico 57 e Gráfico 61, contido, respectivamente, nos apêndices 0, 0 e 0 referentes às concentrações molares dos sobrenadantes do caldo lavado da *S. aureus* adicionados, nessa ordem, das curcuminas Sigma, Natural e Sintética, pôde-se construir o Gráfico 29 em que é possível estabelecer a comparação das interações curcumina-bactéria entre as referidas curcuminas e a *S. aureus*.

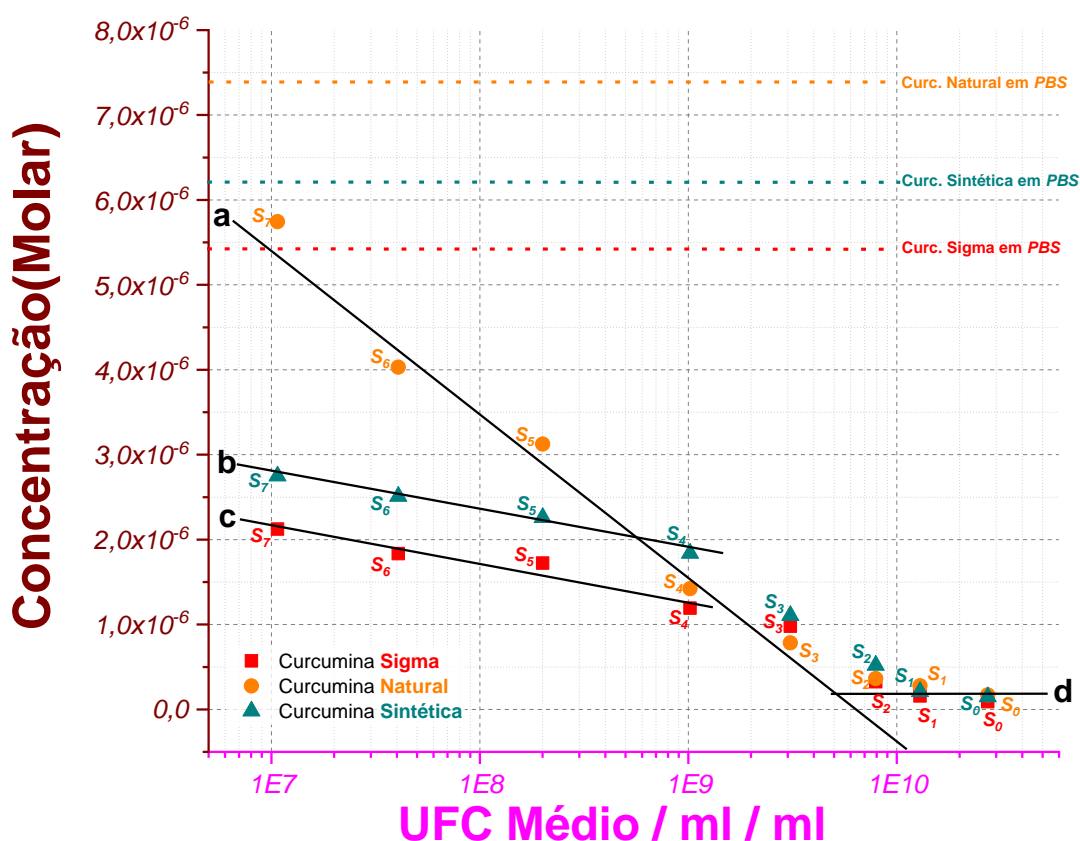


Gráfico 29 - Monologarítmo da concentração molar relativa das diferentes soluções de curcumina, Sigma, Natural e Sintética no sobrenadante do caldo lavado da *S. aureus* das diluições S pelo relativo UFC médio / ml. Este gráfico foi obtido pela composição da leitura e análise dos gráficos Gráfico 53, Gráfico 57 e Gráfico 61, e que estão, respectivamente, nos apêndices 0, 0 e 0. Notamos pelas curvas *b* e *c*, que as curcuminas Sigma e Sintética apresentaram a menor concentração molar de curcumina livre no meio, comportamentos semelhantes de interação e que a interação Sigma-*S.aureus* representou a melhor interação curcumina-bactéria. É possível observar pelas curvas *a* e *d* que as transições entre os regimes de cada curva se dá entre as diluições S_2 e S_3 . E, nota-se que para os grandes UFC médios relativos, S_0 e S_1 , as interações Sigma-*S.aureus*, Natural-*S. aureus* e Sintética-*S.aureus* apresentam comportamento semelhante.

Fonte: Elaborado pelo autor.

No Gráfico 29, pode ser observado um comportamento singular ao se comparar a interação de cada tipo de curcumina com a *S.aureus*, pois cada interação apresentou-se de forma distinta para as mesmas quantidades estimadas de bactérias, nas diluições S_5 , S_6 e S_7 , diferentes concentrações molares estimadas de curcumina livre no sobrenadante, que são acompanhadas pelas curvas *a*, *b* e *c* neste gráfico. Sendo que as concentrações molares na diluição S_7 para as curcuminas Sigma, Natural e Sintética, nessa ordem, no sobrenadante são de, aproximadamente, $2,9 \mu M$, $5,8 \mu M$ e de $2,7 \mu M$. Assim, a interação Sigma-*S.aureus* em todo processo de interação durante as diluições de S_0 até S_7 , por apresentar a menor quantidade de

curcumina livre no sobrenadante, foi a mais bem sucedida entre as interações curcumina-bactéria estudadas, quando comparadas com as curcuminas Sintética, que apresentou comportamento semelhante, e com a Natural.

5.6.4 Comparação entre as interações curcumina-bactéria para as curcuminas Sigma, Natural e Sintética com a bactéria *S. mutans*

Tomando-se como base os mesmos procedimentos analíticos descritos no subcapítulo 5.6.1 utilizado para descrever a interação curcumina-bactéria nos 5.6.2 e 5.6.3, também aqui os serão utilizados para a construção e análise da interação das curcuminas Sigma, Natural e Sintética com a bactéria *S. mutans*.

Então, para isso, construiu-se o Gráfico 30 compondo-o da junção dos gráficos: Gráfico 67, Gráfico 71 e Gráfico 75 dos, respectivos, apêndices 0, 0 e 0. Estes gráficos se referem às concentrações molares relativas das curcuminas livres dos sobrenadantes pelos UFC médios relativos com respeito as interações Sigma-*S. mutans*, Natural-*S. mutans* e Sintética-*S. mutans*.

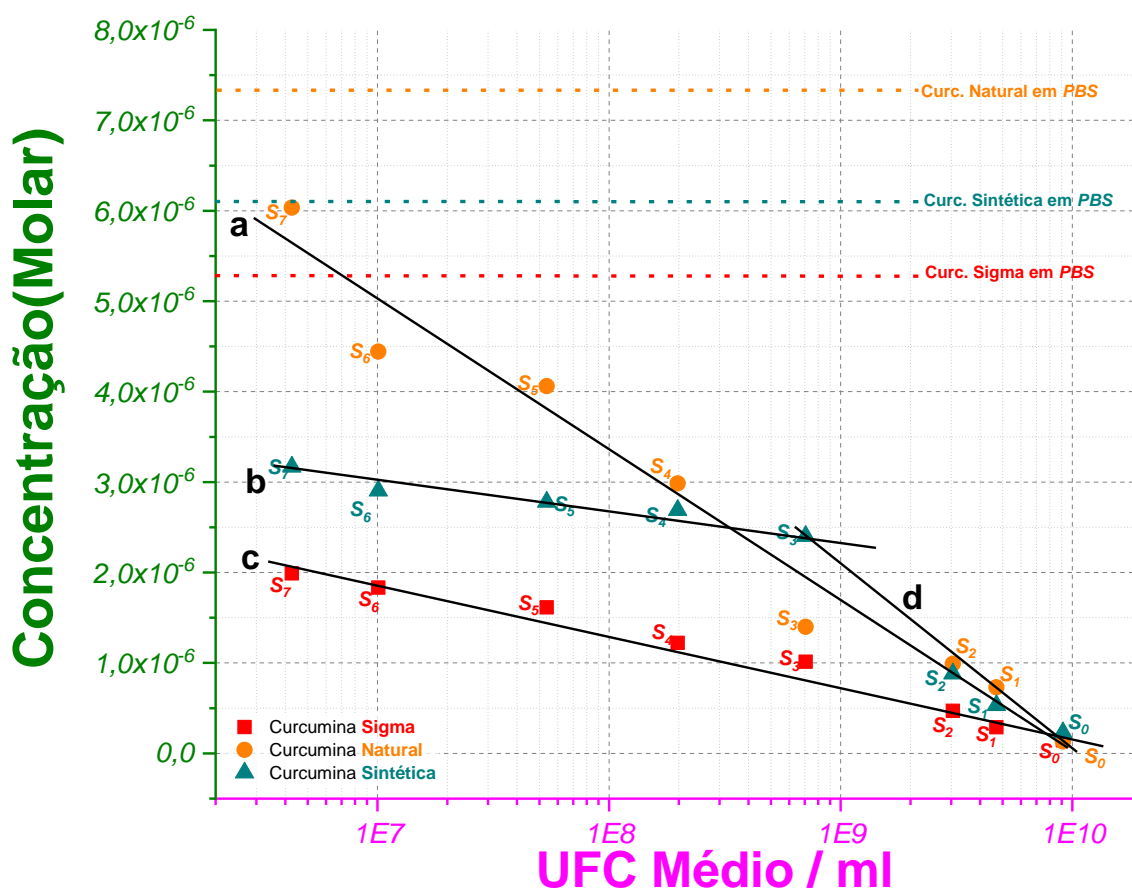


Gráfico 30 - Monologarítmo da concentração molar relativa das diferentes soluções de curcumina, Sigma, Natural e Sintética no sobrenadante do caldo lavado da *S. mutans* das diluições S pelo relativo UFC médio / ml. Este gráfico foi obtido pela composição da leitura e análise dos gráficos Gráfico 67, Gráfico 71 e Gráfico 75, e que estão, respectivamente, nos apêndices 0, 0 e 0. Temos pela curva *a* que a interação Natural-*S. mutans* apresentou-se durante todo o processo das diluições S a maior variação na concentração de curcumina livre entre as três. Notamos pelas curvas *c* e *b* que as interações Sigma-*S. mutans* e Sintética-*S. mutans* apresentaram variações de concentração em regimes distintos e que o comportamento dessa interação entre as diluições S₀ e S₃ ocorrem de maneira semelhante ao regime da Natural-*S. mutans*. Observamos pela curva *c* que apresenta a menor concentração molar de curcumina Sigma livre no sobrenadante, que a interação Sigma-*S. mutans* representou a melhor interação curcumina-bactéria quando comparadas com as das curcuminas Natural e Sintética.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Pode-se observar no Gráfico 30 que as três curcuminas interagiram diferentemente com a *S. mutans* do que com as outras duas bactérias, sendo que a interação Sigma-*S. mutans*, por apresentar a menor variação na concentração molar relativa de curcumina livre, foi a mais eficiente com respeito às outras duas.

A interação Sigma-*S. mutans* aconteceu de forma linear, representado pela curva *c* do Gráfico 30, em que mostra a variação da concentração relativa da curcumina Sigma de forma homogênea durante o processo das diluições S. Esse

mesmo comportamento linear também foi observado na interação Sigma-*S.aureus*, na curva *a* do Gráfico 29. Sugere então, que este comportamento semelhante entre as interações Sigma-*S.mutans* e Sigma-*S.aureus* aconteça devido às bactérias pertencerem à mesma classificação de Gram, sendo gram-positivas, diferentemente da interação Sigma-*E.coli*, sendo a *E. coli* uma gram-negativa.

Ao observar o comportamento da variação da concentração relativa da curcumina Sintética livre no sobrenadante, pelas curvas *b* e *d* do Gráfico 30, nota-se que a interação acontece em dois regimes distintos, com transição de regime próximo à diluição S_4 , da mesma forma que acontece com a curcumina Sintética e a bactéria *S. aureus*, pelas curvas *b* e *d* do Gráfico 29.

5.7 Comparação das interações curcumina-bactéria por tipo de curcumina

Para uma comparação da interação curcumina-bactéria de cada uma das bactérias em a cada curcumina, foram realizados a construção dos últimos três gráficos, sendo um para cada curcumina estudada, Sigma, Natural e Sintética, assim descritos e apresentados em subcapítulos como segue.

5.7.1 Interação da curcumina Sigma com as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *S. mutans*

A primeira curcumina que será mostrada é a curcumina Sigma. No Gráfico 31, é apresentado uma junção de gráficos. O Gráfico 27 do subcapítulo 5.6.1, o Gráfico 53 do apêndice 0 e o Gráfico 67 do apêndice 0. Dessa forma será possível observar o comportamento da interação da curcumina Sigma com as três bactérias estudadas *E. coli*, *S. aureus* e *S. mutans*.

Sobrenadante Sigma-Bactéria

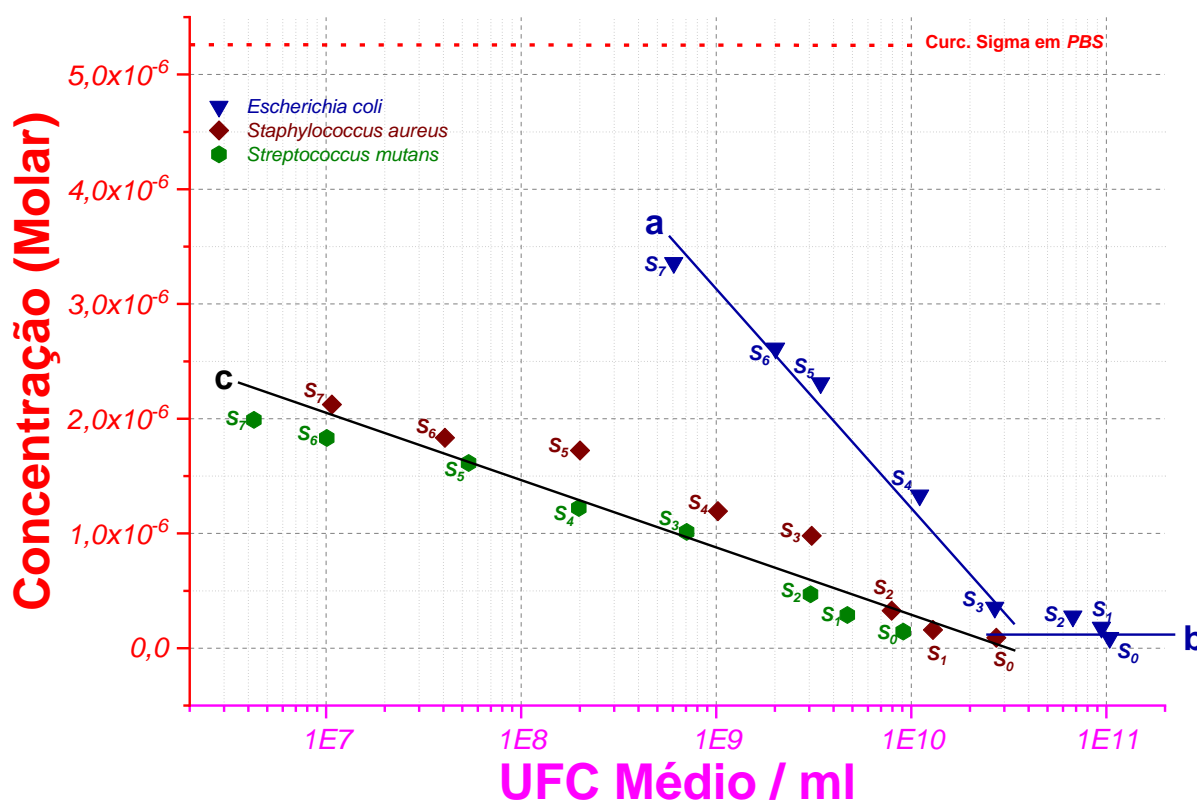


Gráfico 31 - Monologarítmo da concentração molar relativa das soluções de curcumina Sigma livre nos sobrenadantes dos diferentes caldos lavados das bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *S. mutans* das diluições S pelo relativo UFC médio / ml. Nesse gráfico observa-se dois regimes distintos de interação curcumina-bactéria. Um com maior variação na concentração molar relativa da curcumina livre para a bactéria *E. coli*, curvas *a* e *b*, e outro com menor variação na concentração molar relativa de curcumina livre para as bactérias *S. aureus* e *S. mutans*, curva *c*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Neste Gráfico 31, tem-se que as variações das concentrações molares relativas aconteceram em dois regimes homogêneos distintos representados de forma linear pelas curvas *a* e *b*. Na curva *a*, tem-se que a variação da concentração molar relativa da curcumina livre, de aproximadamente $3,3 \mu\text{M}$, foi maior para a bactéria *E. coli* do que para as outras duas bactérias, aproximadamente, sendo de $2,1 \mu\text{M}$ para a *S. aureus* e de $1,9 \mu\text{M}$ para a *S. mutans*. E, pela curva *c*, tem-se que as bactérias *S. aureus* e *S. mutans* comportam-se de maneira semelhante quanto a variação da concentração de curcumina livre. Isso pode ser um indício de que a interação curcumina-bactéria acontece de maneiras distintas entre as bactérias gram-positivas e gram-negativas.

5.7.2 Interação da curcumina Natural com as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *S. mutans*

A fim de observar a agora o comportamento da interação entre as diferentes bactérias estudadas e a curcumina Natural foi construído o Gráfico 32. Este gráfico foi composto pelos gráficos Gráfico 43, Gráfico 57 e Gráfico 71 contidos respectivamente nos apêndices 0, 0 e 0.

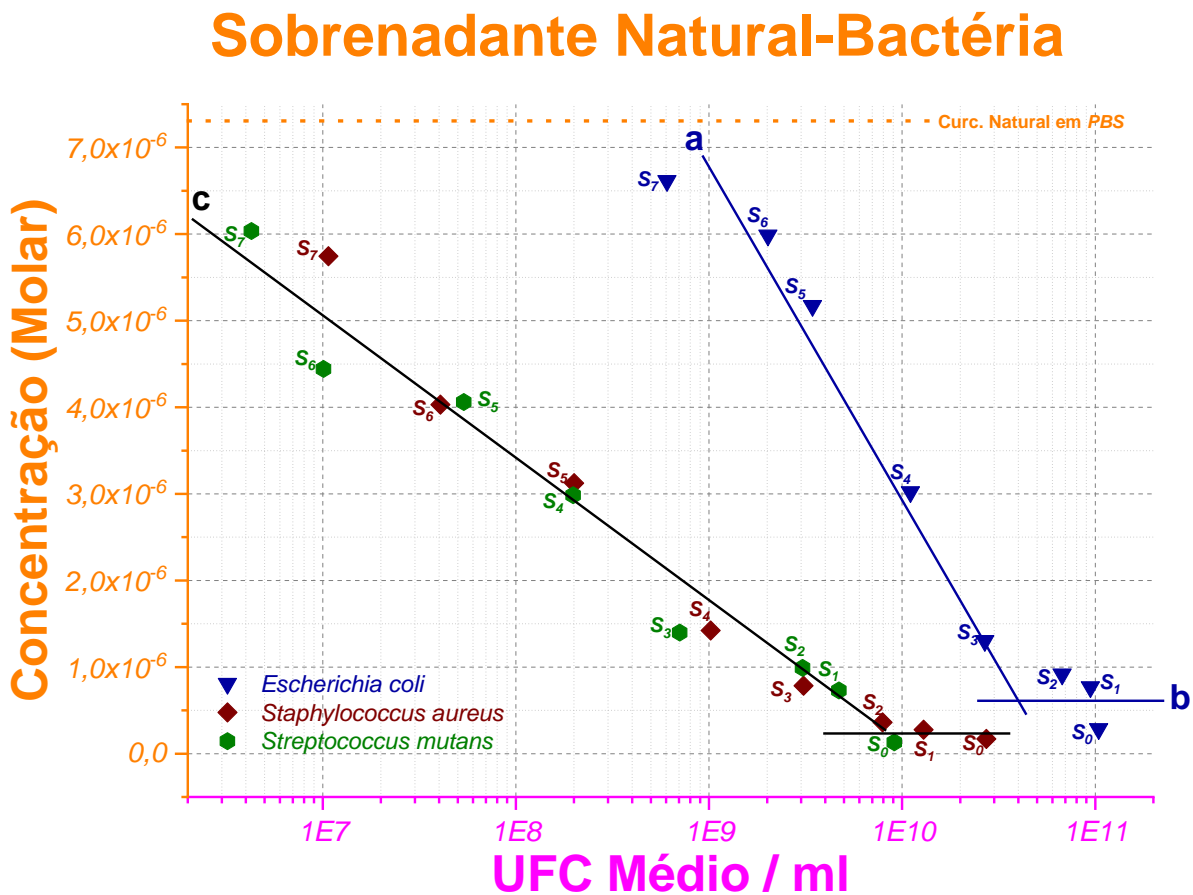


Gráfico 32 - Monologarítmo da concentração molar relativa das soluções de curcumina Natural livre nos sobrenadantes dos diferentes caldos lavados das bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *S. mutans* das diluições S pelo relativo UFC médio / ml. Neste gráfico pode se observar um comportamento não homogêneo da variação das concentrações molares relativas para cada uma das bactérias mas que ao todo segue uma certa linearidade ao longo das diluições S, e que vão se aproximando mostrando regimes semelhantes de comportamento para concentrações entre as diluições de S₀ até S₄, para as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, e até S₃ para a *S. mutans*.

Fonte: Elaborado pelo autor

No Gráfico 32, é possível observar um comportamento, de certa forma, ordenado da variação da concentração molar relativa da curcumina Natural em cada

uma das bactérias, mas que segue uma linearidade se observado como um todo. Tem-se, pela curva *c* que apenas as diluições *S* das bactérias *S. mutans* e *S. aureus* apresentam comportamento semelhante enquanto divergem da *E. coli* como anteriormente mostrado.

5.7.3 Interação da curcumina Sintética com as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *S. mutans*

Por fim, como último, o Gráfico 33 que trará a interação da curcumina sintética com as bactérias até aqui estudadas, também foi elaborado com os dados anteriormente apresentados e que estão contidos respectivamente nos gráficos de número Gráfico 47, Gráfico 61 e Gráfico 75 contidos respectivamente nos anexos 0, 0 e 0.

Sobrenadante Sintética-Bactéria

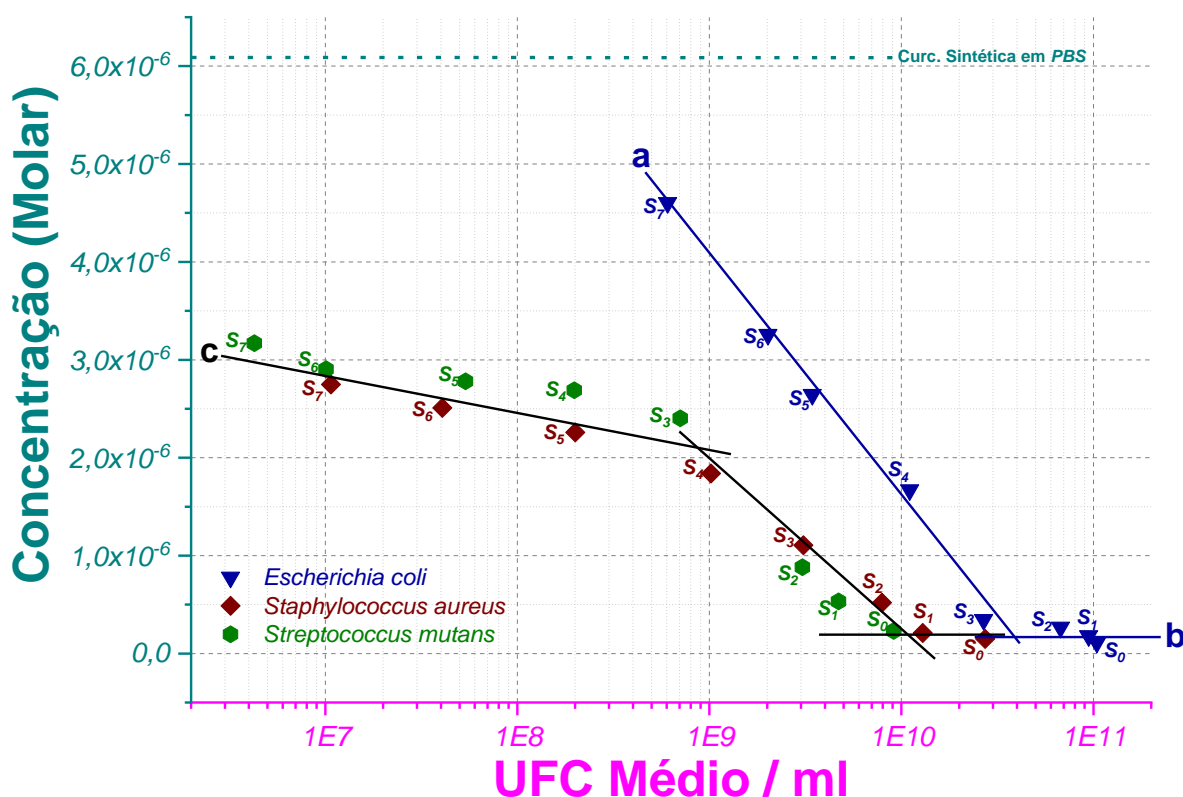


Gráfico 33 - Monologarítmo da concentração molar relativa das soluções de curcumina Sintética livre nos sobrenadantes dos diferentes caldos lavados das bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *S. mutans* das diluições *S* pelo relativo UFC médio / ml.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se no Gráfico 33, dois regimes linearmente apresentados com relação à variação da concentração molar relativa da curcumina Sintética e que estão representados pelas curvas *a* e *b*. Da curva *a* tem-se a variação dessa concentração de curcumina para a bactéria *E. coli* e da curva *c* tem-se um comportamento semelhante para as bactérias *S. aureus* e *S. mutans*, como já visto na interação da curcumina Sigma coma as bactérias, apresentado no Gráfico 31 do subcapítulo 5.7.1.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo buscou o entendimento das propriedades de diferentes curcuminas em solução aquosa, do processo de internalização dessas moléculas em células de culturas bacterianas na forma planctônica e de biofilmes, sendo uma gram-negativa, a *Escherichia coli*, e outras duas gram-positivas, a *Staphylococcus aureus* e a *Streptococcus mutans*, bem como da ação dessas moléculas como agentes fotossensibilizadores (FS) atuando principalmente na parede celular.

Três curcuminas de diferentes origens foram usadas, uma curcumina obtida por extração direta da *Curcuma longa* (natural) e outras duas sintéticas. Medidas de absorvância no UV-Vis mostraram que a curcumina natural possui uma excelente estabilidade temporal quanto à formação de agregados moleculares e formação de particulados em solução aquosa. Já as curcuminas sintéticas apresentam três fases sucessivas que consomem curcumina livre através da formação de agregados moleculares menores que 70 nm e particulados grandes com dimensões da ordem de micrometros.

Na fase inicial rápida (~10 min), uma fração das moléculas livres (~50 %) é transformada em agregados moleculares pequenos. Na fase posterior lenta (70 min), ocorre formação de agregados moleculares maiores de tamanhos menores que 70 nm e, finalmente, uma transição rápida leva formação de particulados grandes com dimensões da ordem de micrometros a partir do consumo dos agregados moleculares pequenos. No equilíbrio, as espécies de curcumina na forma de moléculas livres (2%), de agregados pequenos e de particulados coexistem em solução aquosa em frações que dependem da concentração nominal inicial.

Estudos de microscopia confocal realizados durante a primeira fase demonstram a viabilidade da internalização de curcumina sintética nas células em biofilmes e na forma planctônica.

A internalização da curcumina em solução aquosa é limitada pela permeação nos biofilmes e pela difusão rápida na parede celular, de modo que a saturação no interior das células de *S. mutans* é atingida em de 3 min. A internalização na forma planctônica é limitada apenas por difusão em solução e se processa em tempos da ordem de 1 min.

Medidas da recuperação as fluorescências após fotodegradação (FRAP) mostram que o tempo de difusão da curcumina pela parede celular é da ordem de 12 segundos.

Os tempos de internalização dependem da concentração nominal inicial e a concentrações de curcumina livre no interior das células após a saturação atinge valores na faixa de mMolar. As medidas mostram que a incorporação nas células nos biofilmes é quatro vezes maior que na forma planctônica, o que impõe certa seletividade na fotoinativação das bactérias no biofilme, preservando a forma planctônica.

O resultado pode levar ao desenvolvimento de terapias que desconstroem os biofilmes ao mesmo tempo que preservam a microbiota bucal. Além disso, a forma agregada da curcumina se desestabiliza através da interação com o biofilme, gerando a forma livre da curcumina que é mais adequada para difundir e permear o biofilme.

A forma agregada da curcumina é importante por ser mais estável à fotodegradação em relação à forma livre. Já a curcumina internalizada se encontra na forma livre de modo que as moléculas fotodegradadas são totalmente trocadas para tempos próximos de 10 segundos. Este resultado é importante na terapia de inativação fotodinâmica, uma vez que a curcumina pode ser eliminada do organismo de forma eficiente.

Estudos de inativação fotodinâmica dos biofilmes mostram que doses de luz menores que 1 J/cm^2 entregues durante a varredura da microscopia confocal não produzem dano à parede celular da *S. Mutans*. Por outro lado, dose de luz de 9 J/cm^2 produz a redução de 63% das curcuminas ativas dentro da região estudada. Porém, esta dose produz danos irreversíveis na parede celular que induz a internalização de curcumina ativada pela luz, o que aumenta a concentração de curcumina livre não degradada no interior das células de modo a produzir maior concentração de espécies reativas e inativação mais eficiente das bactérias no biofilme.

Diferentes técnicas ópticas envolvendo medidas de absorbância foram aprimoradas para caracterizar a preparação e contagem de células na forma planctônica. Estes procedimentos levaram a um melhor entendimento dos processos de interação e internalização das diferentes formas de curcumina para bactérias gram-negativas, a *Escherichia coli*, e para as outras duas gram-positivas, a *Staphylococcus aureus* e a *Streptococcus mutans*.

As interações e internalizações das várias curcuminas se processam de forma diferente para a *E. coli* e as outras duas gram-positivas. A curcumina natural, que contém curcuminóides, tem internalização mais efetiva do que as outras duas formas sintéticas.

Por fim, concluí-se que por meio dos resultados e análises obtidos e aqui discutidos que este trabalho contribuirá para a promoção das técnicas e revisão de alguns protocolos de Terapia Fotodinâmica e de Inativação Fotodinâmica tanto no combate a infecções bacterianas quanto as causadas por outros microorganismos.

REFERÊNCIA

- 1 ALLISON, R. R.; MOTA, H. C.; SIBATA, C. H. Clinical PD / PDT in North America : an historical review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.1, n.4, p.263-277, 2004
- 2 MOLLER, K. I. et al. How Finsen's light cured lupus vulgaris. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v. 21, n. 3, p. 118–124, 2005.
- 3 ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501–11, 2010.
- 4 LIPSON, R. L.; BALDES, E. J.; GRAY, M. J. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. **Cancer**, v. 20, n. 12, p. 2255–7, 1967.
- 5 HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436–50, 2004.
- 6 BAGNATO, V. S.; INADA, N. M.; BLANCO, K. C. **Controle microbiológico com ação fotodinâmica**. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2017.
- 7 OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 39, n. 1, p. 1–18, 1997.
- 8 ATHAR, M.; MUKHTAR, H.; BICKERS, D. R. Differential role of reactive oxygen intermediates in photofrin-I- and photofrin-II-mediated photoenhancement of lipid peroxidation in epidermal microsomal membranes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 90, n. 5, p. 652–7, 1988.
- 9 BAGNATO, V. S. **Terapia fotodinâmica dermatológica: Programa TFD Brasil**. São Carlos: Compacta Grafica Editora, 2015.
- 10 NATURE. Wanted: a reward for antibiotic development. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 555–555, 2018.
- 11 SENIOR, M. FDA calls for subscription model to pay for anti-infectives. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1031–1031, 2018.
- 12 GENILLOUD, O. Mining actinomycetes for novel antibiotics in the omics era: are we ready to exploit this new paradigm? **Antibiotics**, v. 7, n. 4, p. 85, 2018.
- 13 CAMA, J.; HENNEY, A. M.; WINTERHALTER, M. Breaching the barrier: quantifying antibiotic permeability across gram-negative bacterial membranes. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 18, p. 3531–3546, 2019.

14 VARELA, M. F.; KUMAR, S. Strategies for discovery of new molecular targets for anti-infective drugs. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 48, p. 57–68, 2019.

15 ROMANO, R. A. **Aumento da eficiência da inativação fotodinâmica pela incorporação de fotossensibilizador induzida por luz em *Candida albicans***. 115p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

16 SANTANA, A. L. F. **Avaliação dos efeitos da curcumina na terapia fotodinâmica aplicada em biofilme supragengival: uma nova abordagem como tratamento coadjuvante em pacientes ortodônticos com gengivite induzida por placa**. 2015. 89p. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2015.

17 SILVA, A. P. DA. **Novas estratégias para o diagnóstico de onicomicose e tratamento por terapia fotodinâmica**. 2017. 197p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

18 MADIGAN, M. T et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda, 2016.

19 MALIK, Z.; LADAN, H.; NITZAN, Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 14, n. 3, p. 262–266, 1992.

20 ALUPOAEI, C. E.; GARCÍA-RUBIO, L. H. An interpretation model for the UV-VIS spectra of microorganisms. **Chemical Engineering Communications**, v. 192, n. 1–3, p. 198–218, 2005.

21 GRIMES, M. Classification of the *Klebsiella-Aerobacter* group with special reference to the cold-tolerant Mesophilic Aerobacter types. **International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy**, v. 11, n. 4, p. 111–130, 1961.

22 BERG, C. H. **E. coli in motion**. Cambridge. Springer. 2003.

23 CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013.

24 LEVINE, M. M. et al. The global enteric multicenter study (GEMS): impetus, rationale, and genesis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. suppl 4, p. S215–S224, 2012.

25 CENTERS for Disease Control and Prevention. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>>. Acesso em: 11 nov. 2017.26

26 HONEYMAN, A.; FRIEDMAN, H.; BENDINELLI, M. **Staphylococcus aureus infection and disease**. 2nd ed. New York: Springer Verlag, 2001.

27 FREEMAN-COOK, L. **Staphylococcus aureus infections**. Broomall:Chelsea House Publications, 2005.

- 28 GUERRA, F. E. et al. Epic immune battles of history: neutrophils vs. *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n.12, p. 1–19, 2017.
- 29 GORWITZ, R. J. et al. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. **Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 9, p. 1226–1234, 2008
- 30 WERTHEIM, H. F. et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, p. 751–762, 2005.
- 31 KOBAYASHI, S. D.; MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses. **American Journal of Pathology**, v. 185, n. 6, p. 1518–1527, 2015
- 32 GERALDE, M. C. **Avaliação do tempo de incubação do fotossensibilizador curcumina em *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* na inativação fotodinâmica.**2013. 58p. Dissertação (Mestrado em Multidisciplinar) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013
- 33 DECARLI, M. C. et al. Different photoresponses of microorganisms: from bioinhibition to biostimulation. **Current Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 473–481, 2016.
- 34 RIPA, L. W. Nursing caries:a comprehensive review. **Pediatric Dentistry**, v. 10, n. 4, p. 268–282, 1988.
- 35 SUGAWARA, E.; NIKAIDO, H. Properties of AdeABC and AdeIJK efflux systems of *Acinetobacter baumannii* compared with those of the AcrAB-TolC system of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7250–7, 2014.
- 36 LEVINSON, W. **Microbiologia médica e imunologia.**12ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2014.
- 37 SATTELY, E. S.; FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. Total biosynthesis: in vitro reconstitution of polyketide and nonribosomal peptide pathways. **Natural Product Reports**, v. 25, n. 4, p. 757, 2008.
- 38 CLARKE, J. K. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 5, n. 3, p. 141–147, 1924.
- 39 HOSHINO, T.; FUJIWARA, T.; KAWABATA, S. Evolution of cariogenic character in *Streptococcus mutans*: horizontal transmission of glycosyl hydrolase family 70 genes. **Scientific Reports**, v. 2, n. 1, p. 518, 2012.
- 40 RAOULT, D.; FOTI, B.; ABOUDHARAM, G. Historical and geographical parallelism between the incidence of dental caries, *Streptococcus mutans* and sugar intake. **European Journal of Epidemiology**, v. 28, n. 8, p. 709–710, 2013.
- 41 LEMOS, J. A. et al. *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm? **Microbiology**, v. 159, Pt 3, p. 436–45, 2013.

42 PASCHOAL, M. A. et al. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against streptococcus mutans in a planktonic culture. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 3, p. 313–319, 2013.

43 LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 4, p. 353–380, 1986.

44 STANIĆ, Z. Curcumin, a compound from natural sources, a true scientific challenge - a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 72, n. 1, p. 1–12, 2017.

45 KAWAKISHI, S. Antioxidative of the P-Diketone moiety in the mechanism of Tetrahydrocurcumin. **Science**, v. 52, n. 4, p. 519–525, 1996.

46 BASNET, P.; SKALKO-BASNET, N. Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 4567–4598, 2011.

47 ZHANG, T. et al. Inhalation treatment of primary lung cancer using liposomal curcumin dry powder inhalers. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 8, n. 3, p. 440–448, 2018.

48 KUMAR, B. et al. Synthetic and medicinal prospective of structurally modified curcumins. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 999, p. 1–2, 2016.

49 GÓMEZ-SIERRA, T. et al. Role of food-derived antioxidants against cisplatin induced-nephrotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 120, p. 230–242, 2018. doi: 10.1016/j.fct.2018.07.018.

50 SAAVEDRA, M. A. et al. Targeted drugs in spondyloarthritis during pregnancy and lactation. **Pharmacological Research**, v. 136, p. 21–28, 2018. doi: 10.1016/j.phrs.2018.08.009.

51 JEENGER, M. K. et al. Curcumin: a pleiotropic phytonutrient in diabetic complications. **Nutrition**, v. 31, n. 2, p. 276–282, 2015.

52 MOLLAZADEH, H. et al. The effect of statin therapy on endoplasmic reticulum stress. **Pharmacological Research**, v. 137, p. 150–158, 2018. doi: 10.1016/j.phrs.2018.10.006

53 RIVERA-MANCÍA, S.; TRUJILLO, J.; CHAVERRI, J. P. Utility of curcumin for the treatment of diabetes mellitus: evidence from preclinical and clinical studies. **Journal of Nutrition and Intermediary Metabolism**, v. 14, p. 29–41, 2018. doi: 10.1016/j.jnim.2018.05.001.

54 HEGER, M. et al. The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 1, p. 222–307, 2014.

55 GERALDE, M. C. **Avaliação do tempo de incubação do fotossensibilizador curcumina em *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* na inativação fotodinâmica.** 2013. 58p. Dissertação (Mestrado em Multidisciplinar)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

56 SEIFERT, E. OriginPro 9.1: Scientific data analysis and graphing software—software review. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v.54, n.5, p.1552, 2014.

57 ORIGINLAB. **OriginPro 2017** Disponivel em:< ww.originlab.com/2017>. Acesso em: 25.10.2019

58 NELSON, K. M. et al. The essential medicinal chemistry of curcumin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 5, p. 1620–1637, 2017.

59 MONDAL, S.; GHOSH, S.; MOULIK, S. P. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV–visible and steady-state fluorescence spectral study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 158, p. 212–218, 2016. doi:[10.1016/j.jphotobiol.2016.03.004](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.004)

60 WIKENE, K. O.; BRUZELL, E.; TØNNESEN, H. H. Characterization and antimicrobial phototoxicity of curcumin dissolved in natural deep eutectic solvents. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, p. 26–32, 2015. doi: [10.1016/j.ejps.2015.09.013](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.09.013)

61 CUNICO, L. P.; ACOSTA, M. C.; TURNER, C. Experimental measurements and modeling of curcumin solubility in CO₂-expanded ethanol. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 130, n. p. 381–388, 2017. doi:[10.1016/j.supflu.2017.06.018](https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.06.018)

62 JAGANNATHAN, R.; ABRAHAM, P. M.; PODDAR, P. Temperature-dependent spectroscopic evidences of curcumin in aqueous medium: a mechanistic study of its solubility and stability. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 50, p. 14533–14540, 2012.

63 KAWANO, S. et al. Analysis of keto-enol tautomers of curcumin by liquid chromatography/mass spectrometry. **Chinese Chemical Letters**, v. 24, n. 8, p. 685–687, 2013.

64 J JAMESON, D. M. **Introduction to fluorescence**. Boca Raton: CRC Press, 2015.

65 PRATAVIEIRA, S. et al. Effectiveness of partially soluble photosensitizer in photodynamic microbiological inactivation: a curcumin example. In: LILGE, L. D. (Ed.). **Medical laser applications and laser tissue interactions**. Munich: Optical Society of America, 2017. v.10417.

66 JOVANOVIC, S. V. et al. How curcumin works preferentially with water soluble antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 13, p. 3064–3068, 2001.

67 MAHMOOD, K. et al. Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 877–890, 2015.

68 SALEM, M.; ROHANI, S.; GILLIES, E. R. Curcumin, a promising anti-cancer therapeutic: a review of its chemical properties, bioactivity and approaches to cancer cell delivery. **RSC Advances**, v. 4, n. 21, p. 10815–10829, 2014.

- 69 KHAIRUTDINOV, R. F.; SERPONE, N. Photophysics of cyanine dyes: subnanosecond relaxation dynamics in monomers, dimers, and H- and J-aggregates in solution. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 101, n. 14, p. 2602–2610, 1997.
- 70 MISHRA, A. et al. Cyanines during the 1990s: a review. **Chemical Reviews**, v. 100, n. 6, p. 1973–2012, 2000.
- 71 EISFELD, A.; BRIGGS, J. S. The J- and H-bands of organic dye aggregates. **Chemical Physics**, v. 324, n. 2, p. 376-384, 2006.
- 72 HESTAND, N. J.; SPANO, F. C. Expanded theory of h- and j-molecular aggregates: the effects of vibronic coupling and intermolecular charge transfer. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 15, p. 7069–7163, 2018.
- 73 ATKINS, P. et al. **Physical chemistry for the life sciences**. 2nd ed. New York:W. H. Freeman and Company, 2011.
- 74 RICHARD P. FEYNMAN et al. **Feynman lectures: mechanics**. 3rd ed. California: Basic Books, 2010. v.1
- 75 THEER, P.; DRAGNEVA, D.; KNOP, M. π SPIM: high NA high resolution isotropic light-sheet imaging in cell culture dishes. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2016.
- 76 XIAO, J. et al. Biofilm three-dimensional architecture influences in situ pH distribution pattern on the human enamel surface. **International Journal of Oral Science**, v. 9, n. 2, p. 74–79, 2017.
- 77 MILO, R.; PHILLIPS, R. **Cell biology by the numbers**. New York: Garland Science, 2015. Disponível em: <<http://book.bionumbers.org/>> Acesso em: 26 out. 2019.
- 78 AMBROSE, W. P. et al. Alterations of single molecule fluorescence lifetimes in near-field optical microscopy. **Science**, v. 265, n. 5170, p. 364–367, 1994.
- 79 PETERSON, B. W. et al. Bacterial cell surface damage due to centrifugal compaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 120–125, 2012.
- 80 DEUPREE, S. M.; SCHOENFISCH, M. H. Quantitative method for determining the lateral strength of bacterial adhesion and application for characterizing adhesion kinetics. **Langmuir**, v. 24, n. 9, p. 4700–4707, 2008.
- 81 ROMANÍ, A. M. et al. Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 3, p. 427–436, 2008.
- 82 STEVENSON, K. et al. General calibration of microbial growth in microplate readers. **Scientific Reports**, v. 6, n. p. 4–10, 2016. doi: 10.1038/srep38828.
- 83 OWEN, T. **Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy**. Palo Alto: Hewlett-Packard, 1996.
- 84 STEWART, J. **Cálculo**. 6ed. São Paulo: Cengage Learning Edições Ltda., 2009. v. 1

APÊNDICE

A. Gráficos das médias das absorvâncias das diluições sequenciais do tipo S da bactéria *S. aureus*

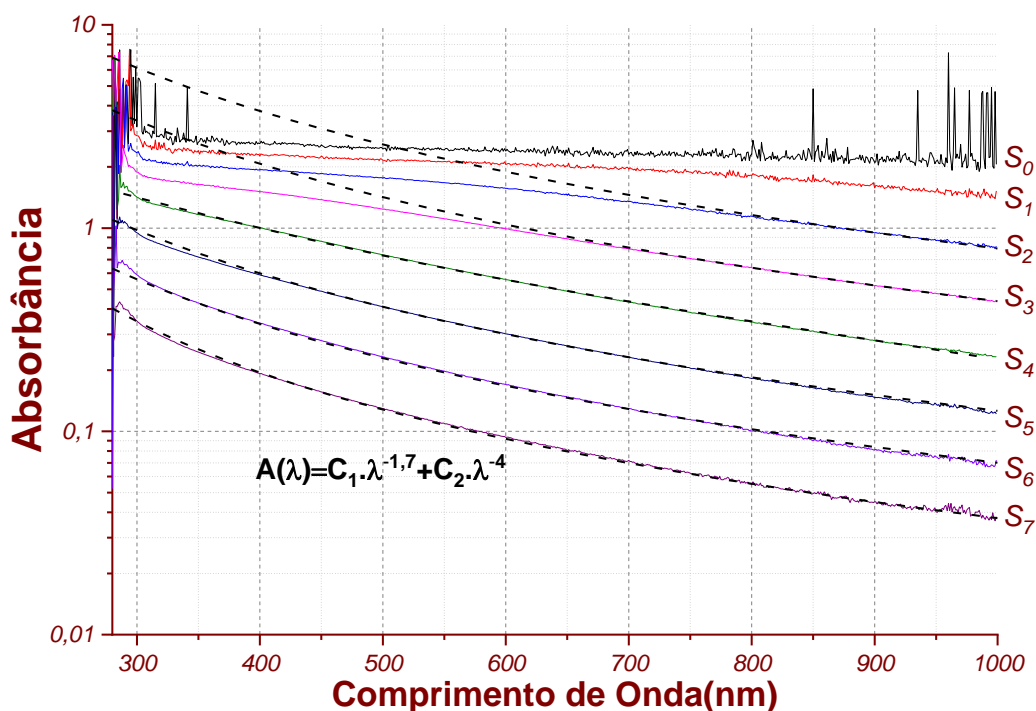


Gráfico 34 – Médias das medidas de absorvância das amostras preparadas do caldo bacteriano da *S. aureus* lavado por 3 vezes e submetido a uma série de 7 diluições sequenciais de 50 % , sendo a primeira, solução inicial, S_0 ,com 100 % da amostra do caldo lavada, a segunda amostra, S_1 , com $\frac{1}{2}$ da S_0 , a terceira amostra, S_2 , com $\frac{1}{4}$ da S_0 , a quarta amostra, S_3 , com $\frac{1}{8}$ da S_0 , a quinta amostra, S_4 , com $\frac{1}{16}$ da S_0 , a sexta amostra, S_5 , com $\frac{1}{32}$ da S_0 , a sétima amostra, S_6 , com $\frac{1}{64}$ da S_0 , e por fim, a oitava amostra, S_7 , com $\frac{1}{128}$ da S_0 . Empreende-se deste gráfico que as curvas referentes às diluições seguem a equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$ apresentada para espalhamentos característicos de partículas pequenas com índices de λ de $-1,7$ e de -4 já relatado anteriormente para a bactéria *S. aureus* na subseção 5.4.1 Nota-se que o comportamento das curvas começa a homogeneizar-se, tende a aproximar-se, em 600 nm, a partir da curva S_3 próximo à absorvância de 1, apresentando características semelhantes para menores comprimentos de onda. Observa-se também que conforme a diluição do caldo lavado aumenta a curva de absorvância diminui, uma característica já esperada, ao passo que quanto maior a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes na solução.

Fonte: Elaborado pelo autor

B. Gráfico das absorvâncias em 600 nm com os UFC médios / ml pelas diluições sequenciais do tipo S para o sobrenadante do caldo bacteriano da *S. aureus*.

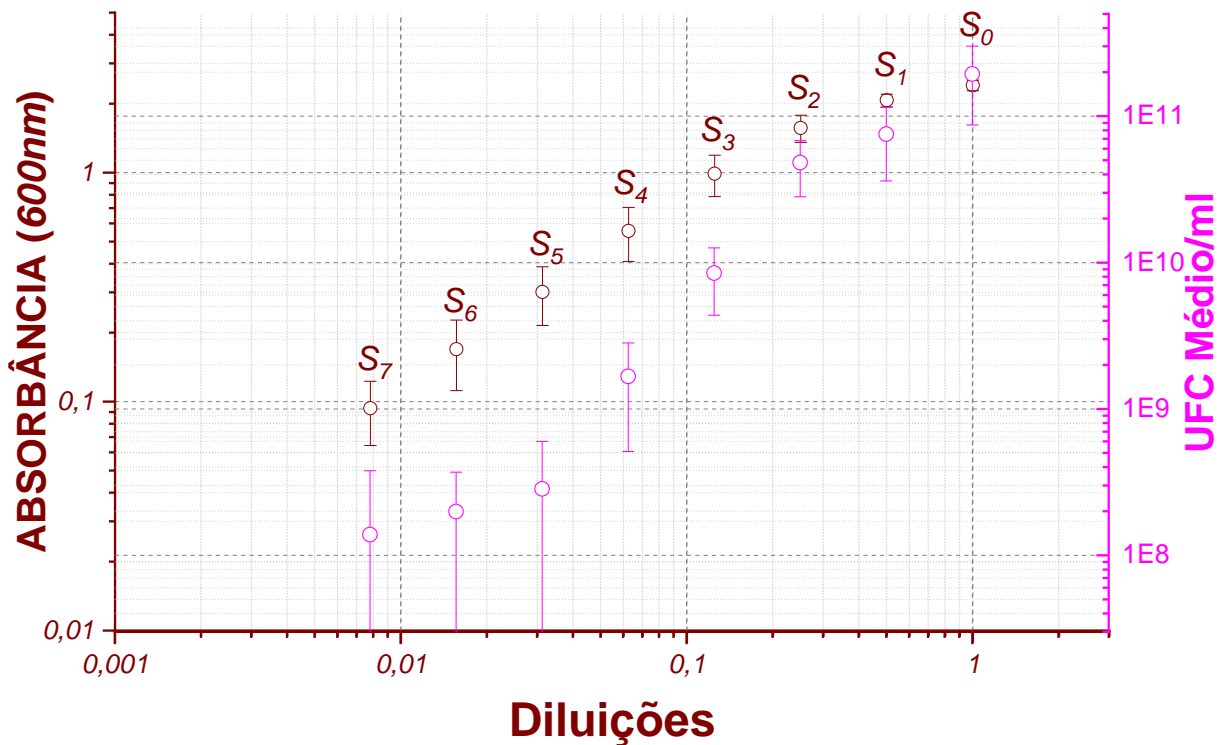


Gráfico 35 – Logarítmico obtido das respectivas absorvâncias do Gráfico 19 retiradas no comprimento de onda de 600 nm para cada curva média de absorvância medida de cada diluição S e correlacionada às médias da contagem das unidades formadoras de colônias por ml (*UFC médio / ml*). Neste gráfico é possível estabelecer uma relação direta entre a média da quadrupla das absorvâncias de cada amostra S e seu *UFC médio / ml*. A linearidade apresentada entre as diluições S₂ e S₇ pelas medidas das médias das absorvâncias também é observada pelas contagens das unidades formadoras de colônias.

Fonte: Elaborado pelo autor

C. Gráficos das absorvâncias das diluições sequenciais da bactéria *S. mutans*

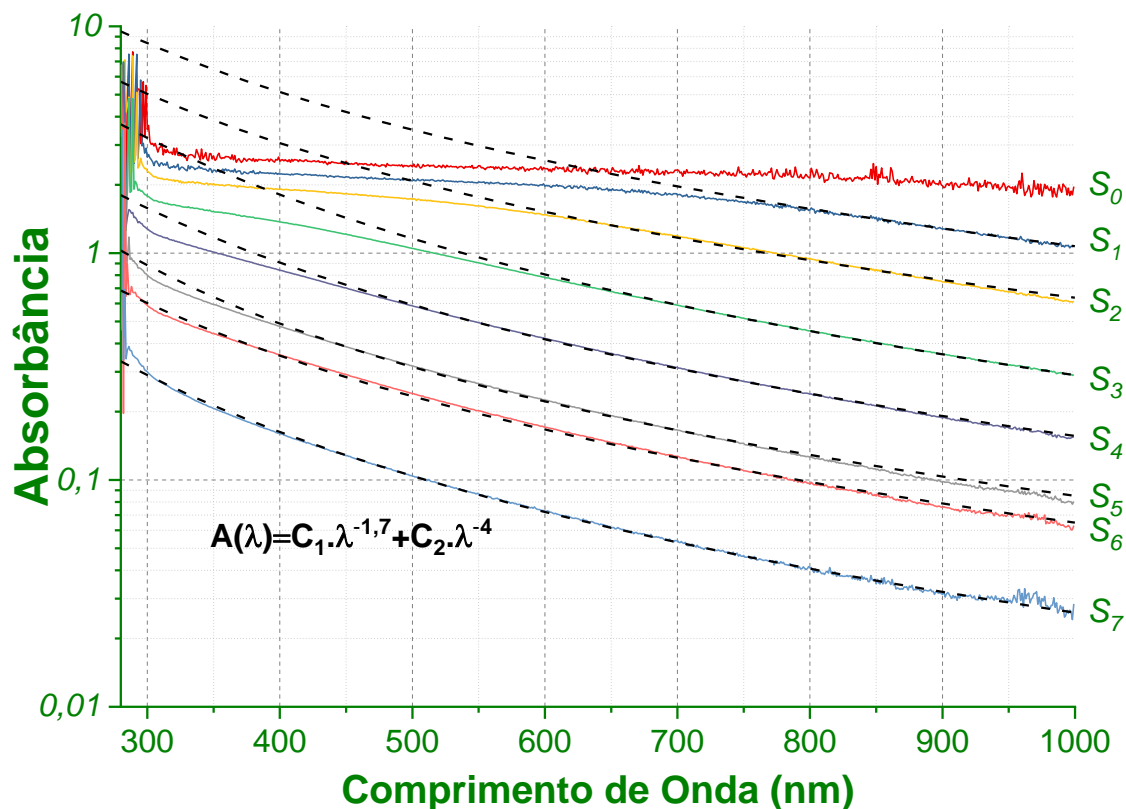


Gráfico 36 – Médias das medidas de absorvância das amostras preparadas do caldo bacteriano da *S. mutans* lavado por 3 vezes e submetido a uma série de 7 diluições sequenciais de 50 %, sendo a primeira, solução inicial, S_0 , com 100 % da amostra do caldo lavada, a segunda amostra, S_1 , com $\frac{1}{2}$ da S_0 , a terceira amostra, S_2 , com $\frac{1}{4}$ da S_0 , a quarta amostra, S_3 , com $\frac{1}{8}$ da S_0 , a quinta amostra, S_4 , com $\frac{1}{16}$ da S_0 , a sexta amostra, S_5 , com $\frac{1}{32}$ da S_0 , a sétima amostra, S_6 , com $\frac{1}{64}$ da S_0 , e por fim, a oitava amostra, S_7 , com $\frac{1}{128}$ da S_0 . Empreende-se deste gráfico que as curvas referentes às diluições seguem a equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$ apresentada para espalhamentos característicos de partículas pequenas com índices de λ de $-1,7$ e de -4 já relatado anteriormente para a bactéria *S. mutans* na subseção 5.4.1 Nota-se que o comportamento das curvas começa a homogeneizar-se, tende a aproximar-se, em 600 nm, a partir da curva S_3 próximo à absorvância de 1, apresentando características semelhantes para menores comprimentos de onda. Observa-se também que conforme a diluição do caldo lavado aumenta a curva de absorvância diminui, uma característica já esperada, ao passo que quanto maior a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes na solução.

Fonte: Elaborado pelo autor

D. Gráfico das absorvâncias em 600 nm com os UFC médios / ml pelas diluições sequenciais do tipo S para o sobrenadante do caldo bacteriano da *S. mutans*.

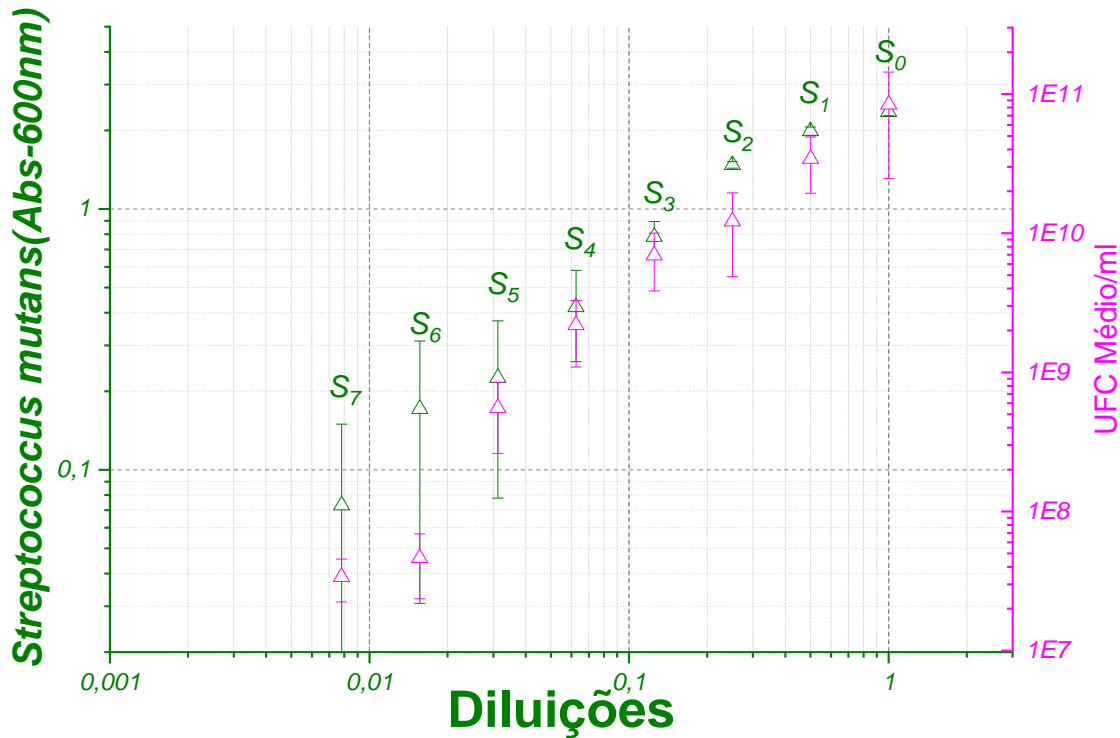


Gráfico 37 – Logarítmico obtido das respectivas absorvâncias do Gráfico 19 retiradas no comprimento de onda de 600 nm para cada curva média de absorvância medida de cada diluição S e correlacionada às médias da contagem das unidades formadoras de colônias por ml (*UFC médio / ml*). Neste gráfico é possível estabelecer uma relação direta entre a média da quadrupla das absorvâncias de cada amostra S e seu *UFC médio / ml*. A linearidade apresentada entre as diluições S₂ e S₇ pelas medidas das médias das absorvâncias também é observada pelas contagens das unidades formadoras de colônias.

Fonte: Elaborado pelo autor

E. Gráfico das correspondências estabelecidas entre as absorbâncias médias do sobrenadante dos caldos lavados da *E. coli* nos comprimentos de onda de 425 nm e 600 nm e o UFC médio / ml referente às diluições do tipo S.

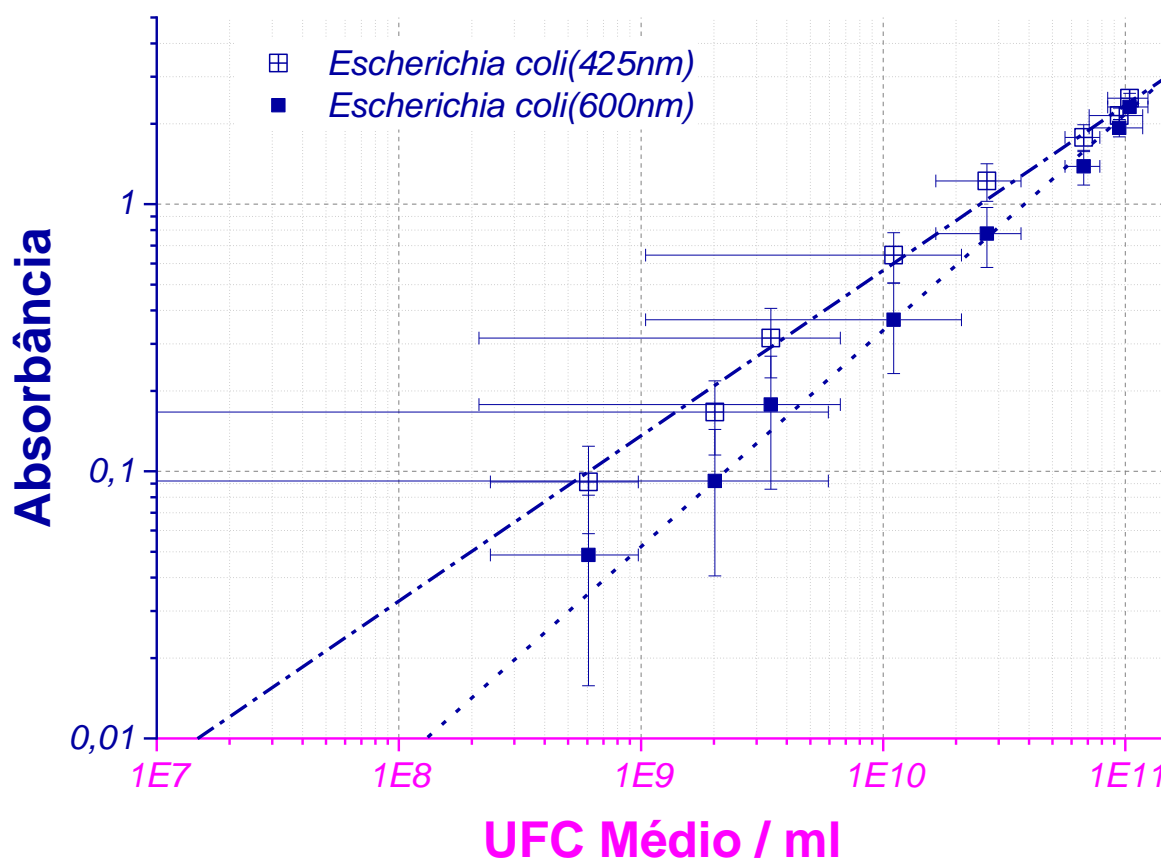


Gráfico 38 Logaritmo que estabelece a relação direta entre as medidas médias das quadruplas de absorbância e o *UFC médio / ml* trabalhado com a bactéria *Escherichia coli*. Para construir este gráfico os dados foram retirados dos Gráfico 19 e Gráfico 20. Observa-se uma relação linear entre as médias das medidas de absorbância tanto em 425 nm quanto em 600 nm e *UFC / ml*, estabelecendo assim uma forma indireta de contagem de células viáveis e a medida de absorbância para esta cepa nestes dois comprimentos de onda.

Fonte: Elaborado pelo autor.

F. Gráficos das absorvâncias médias do caldo lavado da *E. coli* referente às triplicatas biológicas das diluições S obtido por meio do acompanhamento de todos os controles sem a adição de curcumina

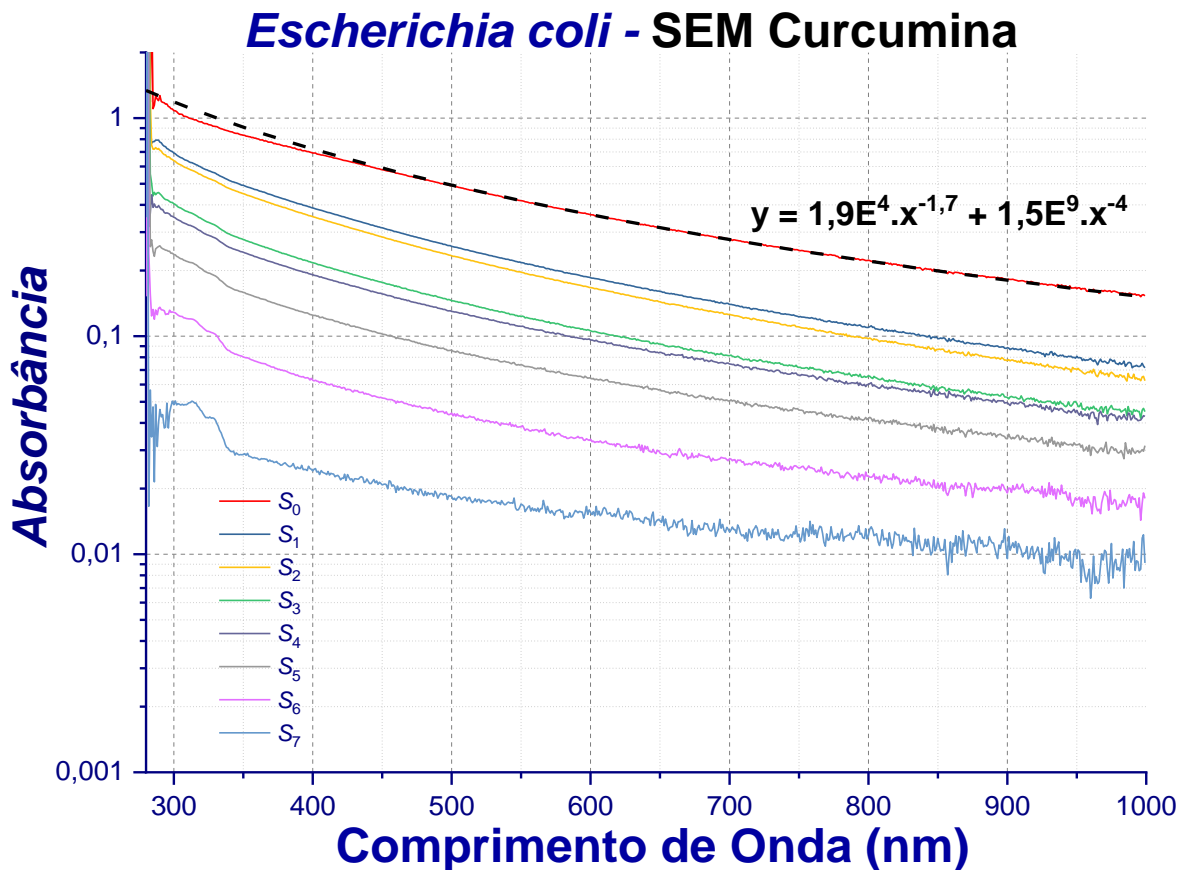


Gráfico 39 – Monologarítmo dos espectros de Absorbância na região espectral UV-Vis das médias das medidas de absorbância das triplicatas biológicas da *E. coli* submetido a uma série de 7 diluições sequenciais de 50 %, sendo a primeira, solução inicial, S_0 , com 100 % da amostra do caldo lavado, a segunda amostra, S_1 , com $\frac{1}{2}$ da S_0 , a terceira amostra, S_2 , com $\frac{1}{4}$ da S_0 , a quarta amostra, S_3 , com $\frac{1}{8}$ da S_0 , a quinta amostra, S_4 , com $\frac{1}{16}$ da S_0 , a sexta amostra, S_5 , com $\frac{1}{32}$ da S_0 , a sétima amostra, S_6 , com $\frac{1}{64}$ da S_0 , e por fim, a oitava amostra, S_7 , com $\frac{1}{128}$ da S_0 . Empreende-se deste gráfico que as curvas referentes às diluições seguem a equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$ apresentada para espalhamentos característicos de partículas pequenas com índices de λ de $-1,7$ e de -4 já relatado para a *E. coli* na subseção 5.4.1. Observa-se que conforme a diluição do caldo lavado aumenta a curva de absorbância diminui, uma característica já esperada, ao passo que quanto maior a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes na solução.

Fonte: Elaborado pelo autor

G. Gráficos das absorvâncias médias do caldo lavado da *E. coli* referente às triplicatas biológicas das diluições S com adição da curcumina Natural

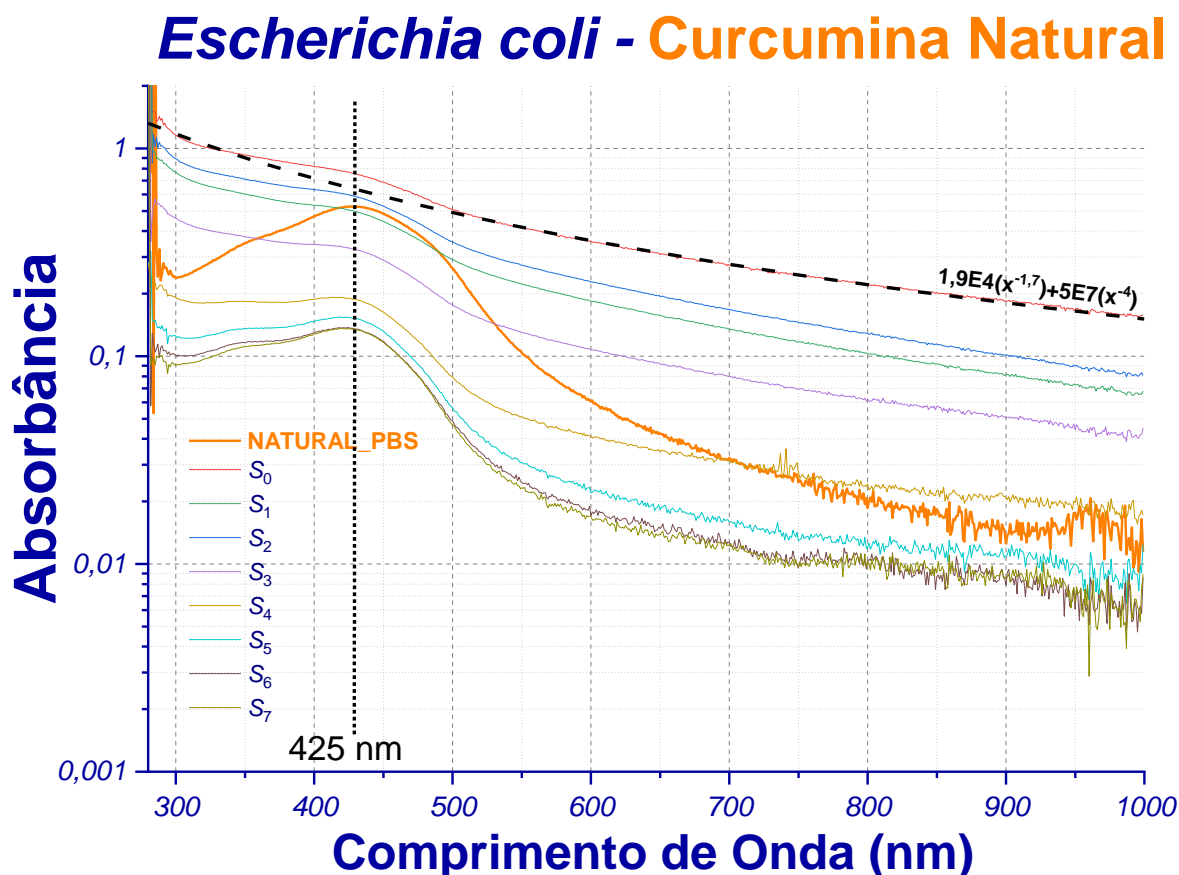


Gráfico 40 – Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das médias das triplicatas biológicas das diferentes diluições S referente às diferentes concentrações do sobrenadante do caldo bacteriano lavado da *E. coli*, com uma alíquota de $3 \mu\text{l}$, em cada uma das diluições S, retiradas das soluções stock de $10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ da curcumina Natural preparada em solução de etanol, na concentração final de $57,4 \mu\text{M}$ por microtubo de 1,5 ml. Empreende-se que todas as curvas médias apresentam os picos característicos da presença da curcumina Natural no comprimento de onda de 425 nm, além disso, salienta-se dois diferentes regimes de curvas de absorvância ao considerarmos os espalhamentos para os comprimentos de onda entre 600 nm e 1000 nm. Um característico da bactéria *E. coli* para as curvas médias S₀, S₁ e S₂, que tem a lei de formação na equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, em que S₁, por exemplo, apresenta a equação $A(\lambda) = 1,9 \times 10^4 \cdot \lambda^{-1,7} + 5,0 \times 10^7 \cdot \lambda^{-4}$ e com espalhamentos característicos de partículas pequenas e índices de λ de $-1,7$ e -4 . Além disso, nota-se que conforme as concentrações do caldo bacteriano lavado vão diminuindo as curvas de absorvância também vão, uma vez que quanto maior for a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes no meio.

Fonte: Elaborado pelo autor

H. Gráfico do translado vertical das curvas referentes às absorvâncias médias do caldo lavado da *E. coli* referente às triplicatas biológicas das diluições S com adição da curcumina Natural

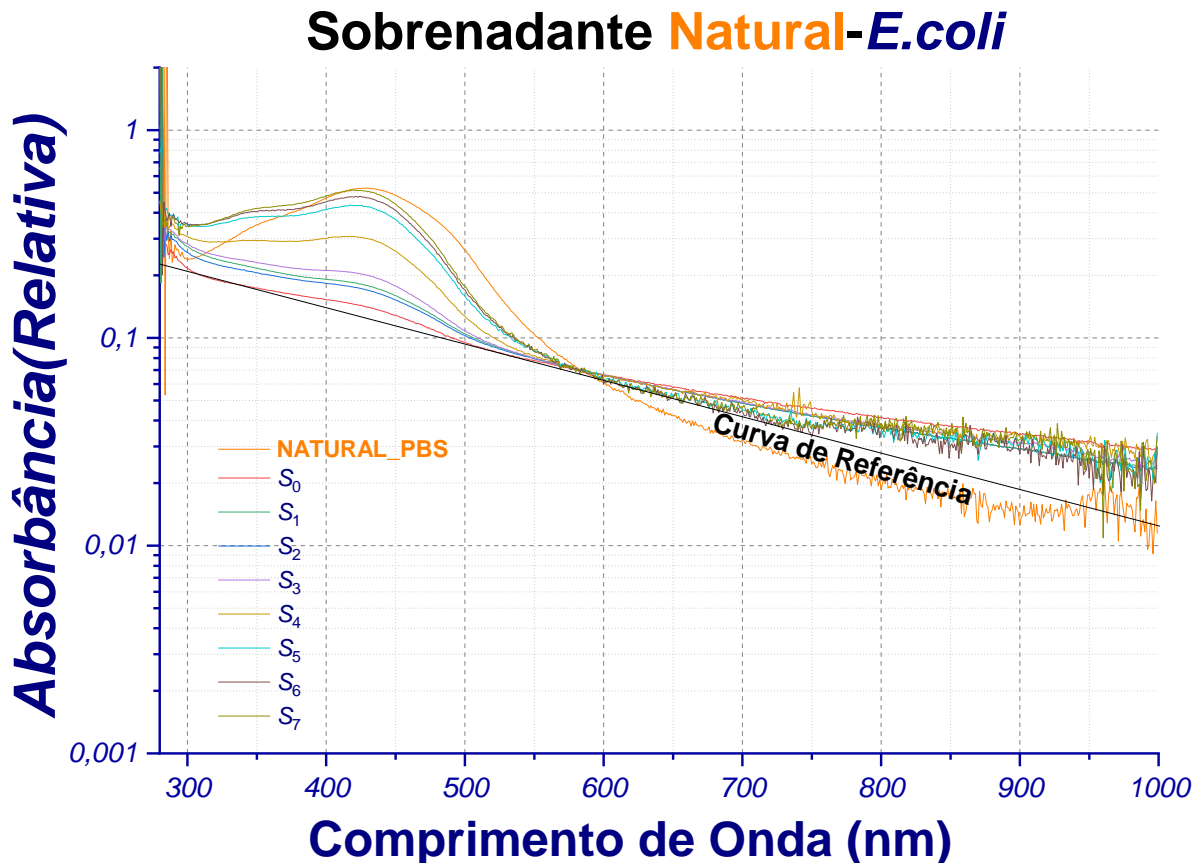


Gráfico 41 – Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das curvas médias transladas em relação ao eixo y obtidas do anexo 0. Observa-se que ao realizar o translado das curvas, no comprimento de onda de $585,43 \text{ nm}$ e absorvância de $0,0693$, todas as curvas passam por este ponto específico permitindo-se com isso desprezar o ruído de fundo gerado a partir do comprimento de onda de $575,71 \text{ nm}$ para as futuras análises, por se tratar de uma região em que o espalhamento se deve à formação de *clusters* e aglomerados particulares como tratado no subcapítulo 5.1 Caracterização óptica das curcuminas. Além disso, tem-se que ao transladar essas curvas há uma inversão do posicionamento de cada uma delas em relação à originalmente traçada. Note que a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_0 que aparecia em primeiro, de cima para baixo, no anexo 0, agora aparece em último, sendo a mais próxima da curva de referência, e a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_7 que aparecia em último, de cima para baixo, no anexo 0, agora está em primeiro, ou seja, em relação à reta de referência esta é a mais distante.

Fonte: Elaborado pelo autor.

- I. Gráfico analítico percentual dos picos em 425 nm das curvas transladadas das absorvâncias médias do caldo lavado da *E. coli* referente às triplicatas biológicas das diluições S e com adição da curcumina Natural

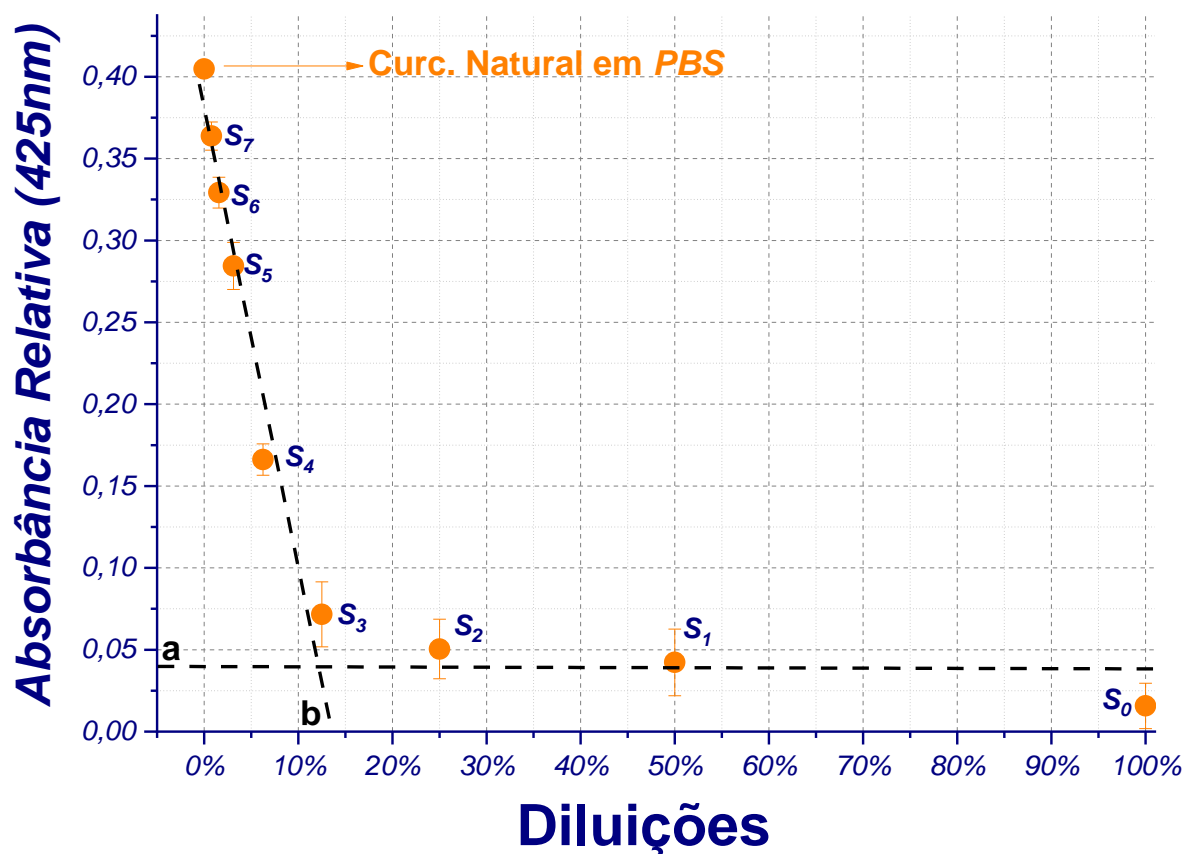


Gráfico 42 – Monologarítmo resultante da análise dos picos, no comprimento de onda de 425 nm, das curvas transladadas apresentadas no Gráfico 41. Observa-se dois regimes significativos em relação ao comportamento da quantidade de curcumina Natural que interagiu com a *E. coli*, que estão representados pelas retas tracejadas em preto. A curva (b) mostra um regime de acentuado de crescimento da absorbância relativa referente à curcumina livre no sobrenadante a partir da diluição S₃ e até a diluição S₇. A curva (a) apresenta uma pequena variação da quantidade de curcumina Natural livre no meio, apresentada pela variação da absorbância de 0,07 até 0,01, entre as diluições S₀ e S₃.

Fonte: Elaborado pelo autor

- J. Gráfico relativo da Concentração molar da curcumina Natural livre no sobrenadante dos picos em 425 nm das curvas transladadas das absorvâncias médias do caldo lavado da *E. coli* referente às triplicatas biológicas das diluições S pelo relativo UFC médio / ml

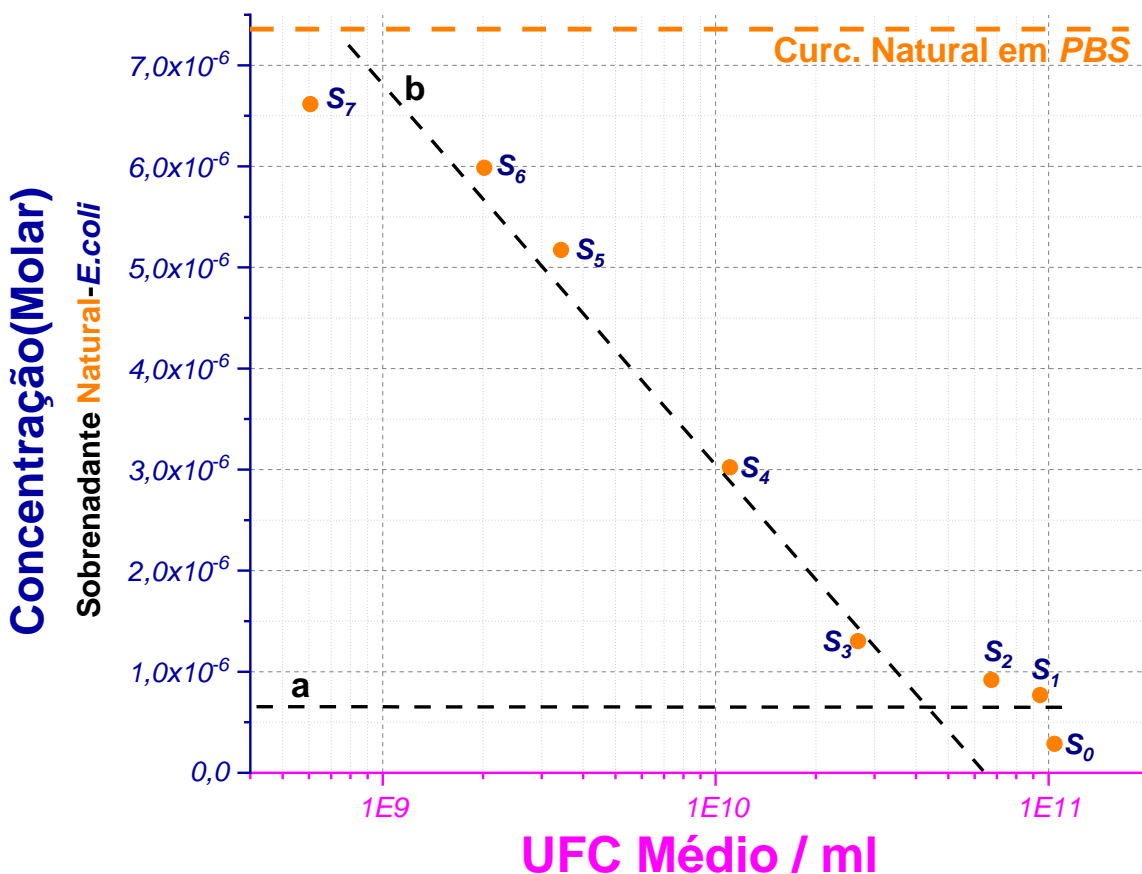


Gráfico 43 – Monologarítmico construído com as informações do Gráfico 42, para o eixo das ordenadas obtido pela correlação das absorvâncias relativas no comprimento de onda de 425 nm do sobrenadante contendo curcumina Natural livre com a concentração molar do Gráfico 1-b, e o eixo das abscissas obtido pelas informações do Gráfico 38, apêndice 0. Evidenciam-se dois regimes para as diferentes concentrações molares de curcumina Sigma livre que estão representados pelas linhas tracejadas em preto. A curva (a) representa uma pequena variação da concentração molar da curcumina livre do sobrenadante de, aproximadamente, 0,29 μM , S₀, para 1,3 μM , S₃, em uma variação de UFC médio / ml de $1,24 \times 10^{10}$ para $1,85 \times 10^9$, respectivamente, de S₀ para S₃. A curva (b) mostra uma grande variação da concentração molar da curcumina Sigma livre no sobrenadante de, aproximadamente, 1,3 μM em S₃ para 6,6 μM em S₇, acompanhada por certa linearidade pela variação do UFC médio / ml de $1,85 \times 10^9$ em S₃ para $5,55 \times 10^7$ em S₇.

Fonte: Elaborado pelo autor

K. Gráficos das absorvâncias médias do caldo lavado da *E. coli* referente às triplicatas biológicas das diluições S com adição da curcumina Sintética

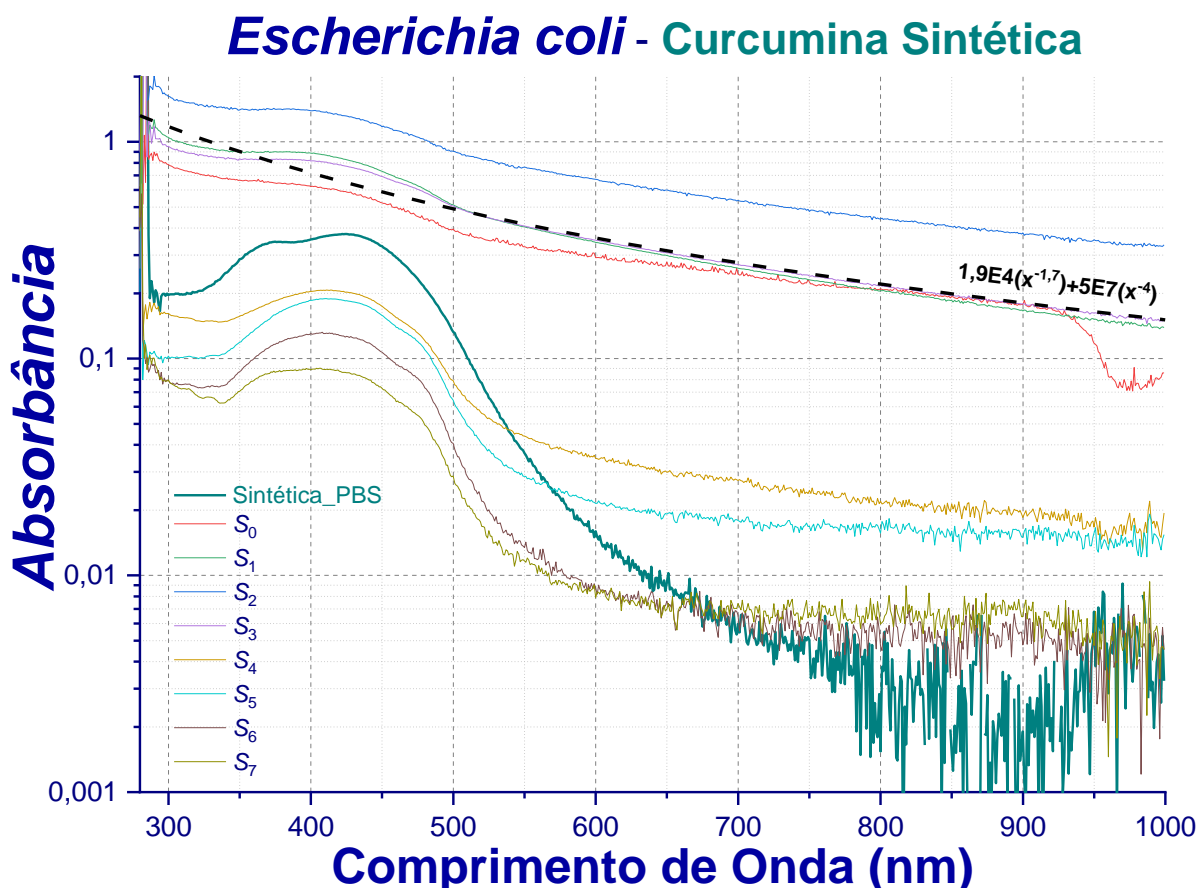


Gráfico 44 – Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das médias das triplicatas biológicas das diferentes diluições S referente às diferentes concentrações do sobrenadante do caldo bacteriano lavado da *E. coli*, com uma alíquota de $3 \mu\text{l}$, em cada uma das diluições S, retiradas das soluções stock de $10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ da curcumina Natural preparada em solução de etanol, na concentração final de $54,3 \mu\text{M}$ por microtubo de 1,5 ml. Empreende-se que todas as curvas médias apresentam os picos característicos da presença da curcumina Sintética no comprimento de onda de 425 nm, além disso, salienta-se dois diferentes regimes de curvas de absorvância ao considerarmos os espalhamentos para os comprimentos de onda entre 600 nm e 1000 nm. Um característico da bactéria *E. coli* para as curvas médias S₀, S₁ e S₂, que tem a lei de formação na equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, em que S₁, por exemplo, apresenta a equação $A(\lambda) = 1,9 \times 10^4 \cdot \lambda^{-1,7} + 5,0 \times 10^7 \cdot \lambda^{-4}$ e com espalhamentos característicos de partículas pequenas e índices de λ de $-1,7$ e -4 . Além disso, nota-se que conforme as concentrações do caldo bacteriano lavado vão diminuindo as curvas de absorvância também vão, uma vez que quanto maior for a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes no meio.

Fonte: Elaborado pelo autor

- L. Gráfico do translado vertical das curvas referentes às absorvâncias médias do caldo lavado da *E. coli* referente às triplicatas biológicas das diluições S com adição da curcumina Sintética

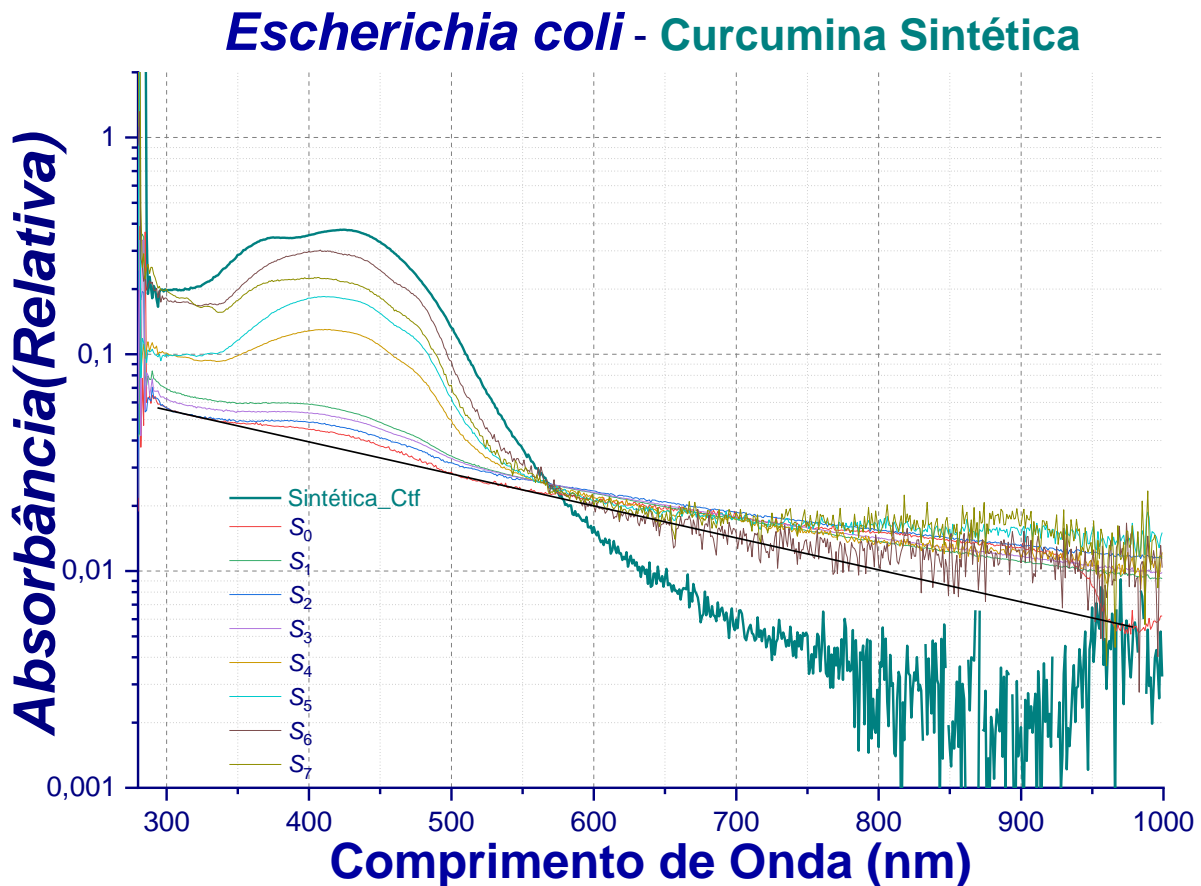


Gráfico 45 – Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das curvas médias transladas em relação ao eixo y obtidas do anexo 0. Observa-se que ao realizar o translado das curvas, no comprimento de onda de 573,13 nm e absorvância de 0,0235, todas as curvas passam por este ponto específico permitindo-se com isso desprezar o ruído de fundo gerado a partir do comprimento de onda de 573,13 nm para as futuras análises, por se tratar de uma região em que o espalhamento se deve à formação de *clusters* e aglomerados particulares como tratado no subcapítulo 5.1 Caracterização óptica das curcuminas. Além disso, tem-se que ao transladar essas curvas há uma inversão do posicionamento de cada uma delas em relação à originalmente traçada. Note que a curva referente às absorvâncias médias da diluição S₀ que aparecia em primeiro, de cima para baixo, no anexo 0, agora aparece em último, sendo a mais próxima da curva de referência, e a curva referente às absorvâncias médias da diluição S₇ que aparecia em último, de cima para baixo, no anexo 0, agora está em primeiro, ou seja, em relação à reta de referência esta é a mais distante.

Fonte: Elaborado pelo autor.

M. Gráfico analítico percentual dos picos em 425 nm das curvas transladadas das absorbâncias médias do caldo lavado da *E. coli* referente às triplicatas biológicas das diluições S e com adição da curcumina Sintética

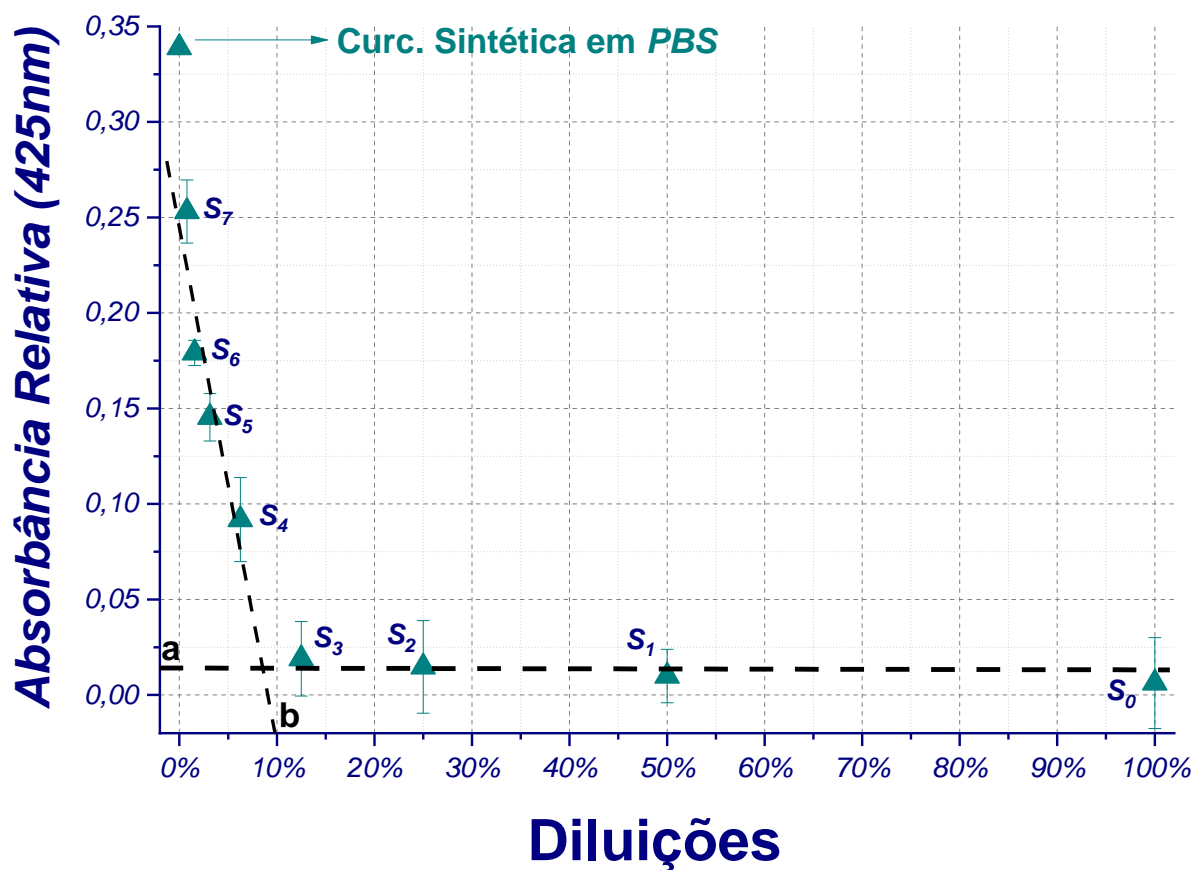


Gráfico 46 – Monologarítmo resultante da análise dos picos, no comprimento de onda de 425 nm, das curvas transladadas apresentadas no Gráfico 45. Observa-se dois regimes significativos em relação ao comportamento da quantidade de curcumina Sintética que interagiu com a *E. coli*, que estão representados pelas retas tracejadas em preto. A curva (b) mostra um regime de acentuado de crescimento da absorbância relativa referente à curcumina livre no sobrenadante a partir da diluição S₃ e até a diluição S₇. A curva (a) apresenta uma pequena variação da quantidade de curcumina Natural livre no meio, apresentada pela variação da absorbância de 0,07 até 0,01, entre as diluições S₀ e S₃.

Fonte: Elaborado pelo autor

N. Gráfico relativo da Concentração molar da curcumina Sintética livre no sobrenadante dos picos em 425 nm das curvas transladadas das absorvâncias médias do caldo lavado da *E. coli* referente às triplicatas biológicas das diluições S pelo relativo UFC médio / ml

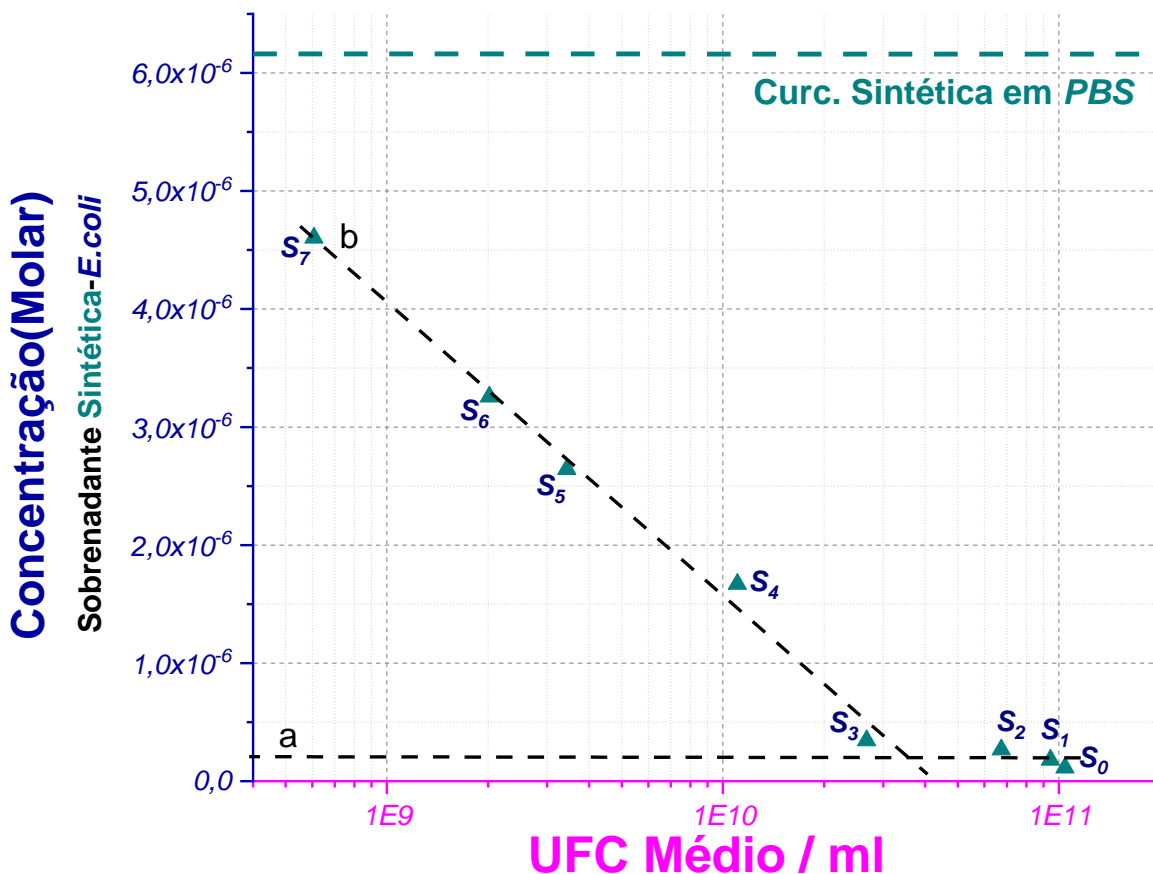


Gráfico 47 Monologarítmico construído com as informações do Gráfico 42, para o eixo das ordenadas obtido pela correlação das absorvâncias relativas no comprimento de onda de 425 nm do sobrenadante contendo curcumina Natural livre com a concentração molar do Gráfico 1-b, e o eixo das abscissas obtido pelas informações do Gráfico 38, apêndice 0. Evidenciam-se dois regimes para as diferentes concentrações molares de curcumina Sigma livre que estão representados pelas linhas tracejadas em preto. A curva (a) representa uma pequena variação da concentração molar da curcumina livre do sobrenadante de, aproximadamente, 0,11 μM , S₀, para 0,34 μM , S₃, em uma variação de UFC médio / ml de $1,24 \times 10^{10}$ para $1,85 \times 10^9$, respectivamente, de S₀ para S₃. A curva (b) mostra uma grande variação da concentração molar da curcumina Sigma livre no sobrenadante de, aproximadamente, 0,34 μM em S₃ para 4,6 μM em S₇, acompanhada por certa linearidade pela variação do UFC médio / ml de $1,85 \times 10^9$ em S₃ para $5,55 \times 10^7$ em S₇.

Fonte: Elaborado pelo autor

- O. Gráfico das correspondências estabelecidas entre as absorbâncias médias do sobrenadante dos caldos lavados da *S. aureus* nos comprimentos de onda de 425 nm e 600 nm e o UFC médio / ml referente às diluições do tipo S

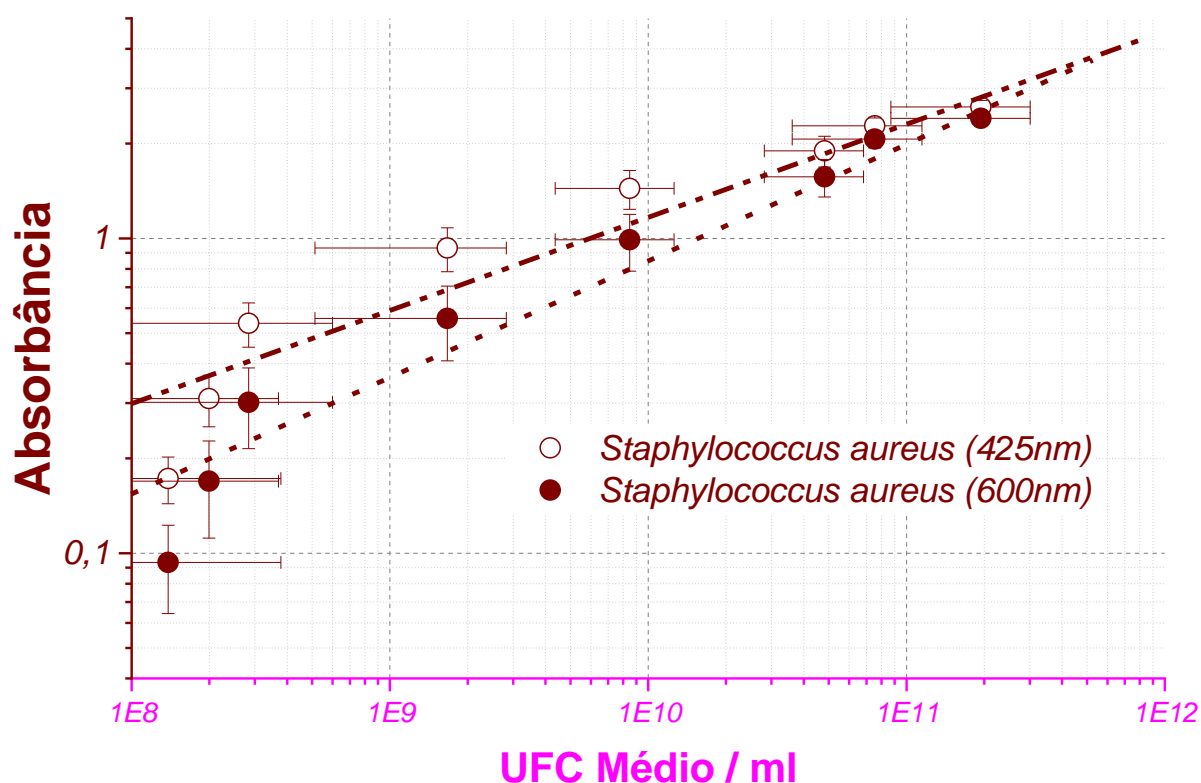


Gráfico 48 Logaritmo que estabelece a relação direta entre as medidas médias das quadruplas de absorbância e o UFC médio / ml trabalhado com a bactéria *Staphylococcus aureus*. Para construir este gráfico os dados foram retirados dos Gráfico 35 e Gráfico 22. Observa-se uma relação linear entre as médias das medidas de absorbância tanto em 425 nm quanto em 600 nm e UFC / ml, estabelecendo assim uma forma indireta de contagem de células viáveis e a medida de absorbância para esta cepa nestes dois comprimentos de onda.
Fonte: Elaborado pelo autor.

P. Gráfico das absorvâncias médias do caldo lavado da *S. aureus* referente às triplicatas biológicas das diluições *S* obtido por meio do acompanhamento de todos os controles sem a adição de curcumina

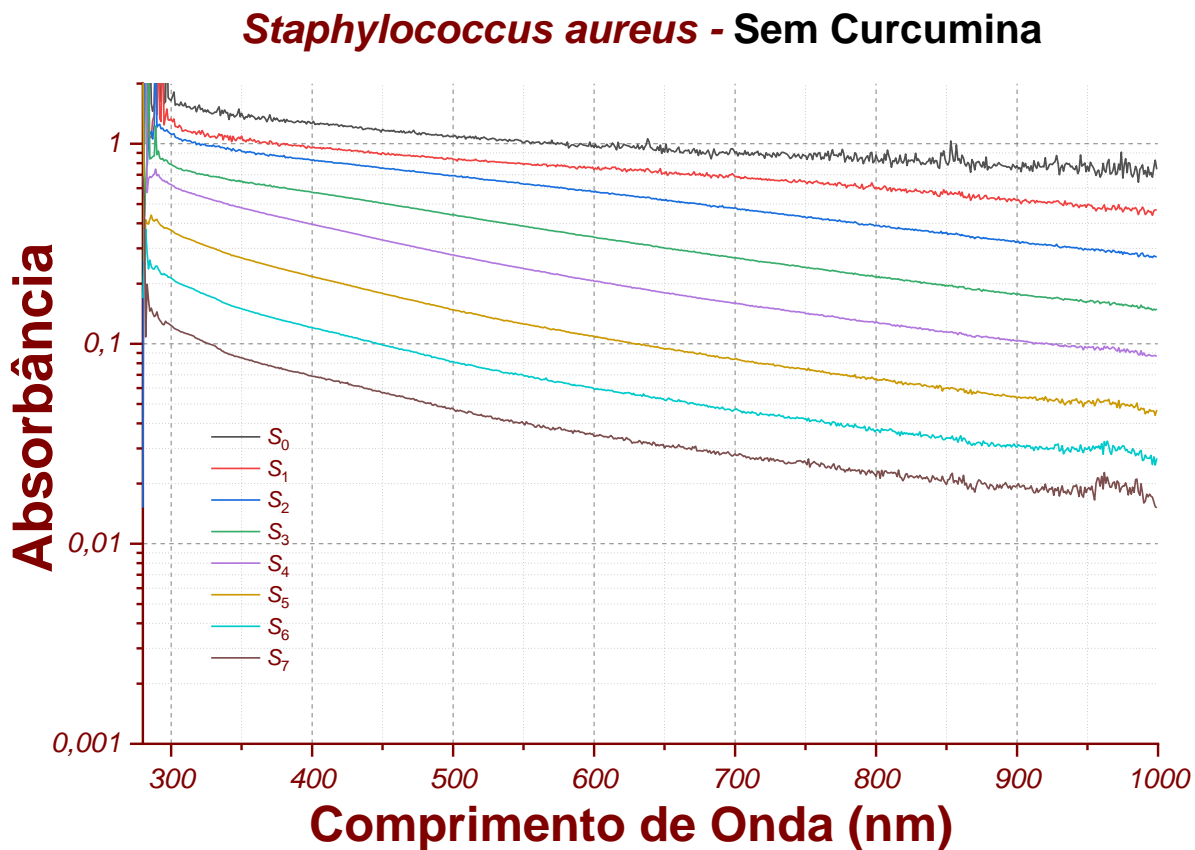


Gráfico 49 Monologarítmo dos espectros de Absorbância na região espectral UV-Vis das médias das medidas de absorbância das triplicatas biológicas da *S. aureus* submetido a uma série de 7 diluições sequenciais de 50 %, sendo a primeira, solução inicial, S_0 , com 100 % da amostra do caldo lavado, a segunda amostra, S_1 , com $\frac{1}{2}$ da S_0 , a terceira amostra, S_2 , com $\frac{1}{4}$ da S_0 , a quarta amostra, S_3 , com $\frac{1}{8}$ da S_0 , a quinta amostra, S_4 , com $\frac{1}{16}$ da S_0 , a sexta amostra, S_5 , com $\frac{1}{32}$ da S_0 , a sétima amostra, S_6 , com $\frac{1}{64}$ da S_0 , e por fim, a oitava amostra, S_7 , com $\frac{1}{128}$ da S_0 . Empreende-se deste gráfico que as curvas referentes às diluições seguem a equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$ apresentada para espalhamentos característicos de partículas pequenas com índices de λ de $-1,7$ e de -4 já relatado para a *S. aureus* na subseção 5.4.1. Observa-se que conforme a diluição do caldo lavado aumenta a curva de absorbância diminui, uma característica já esperada, ao passo que quanto maior a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes na solução.

Fonte: Elaborado pelo autor

Q. Gráfico das absorvâncias médias do caldo lavado da *S. aureus* referente às triplicatas biológicas das diluições S com adição da curcumina Sigma

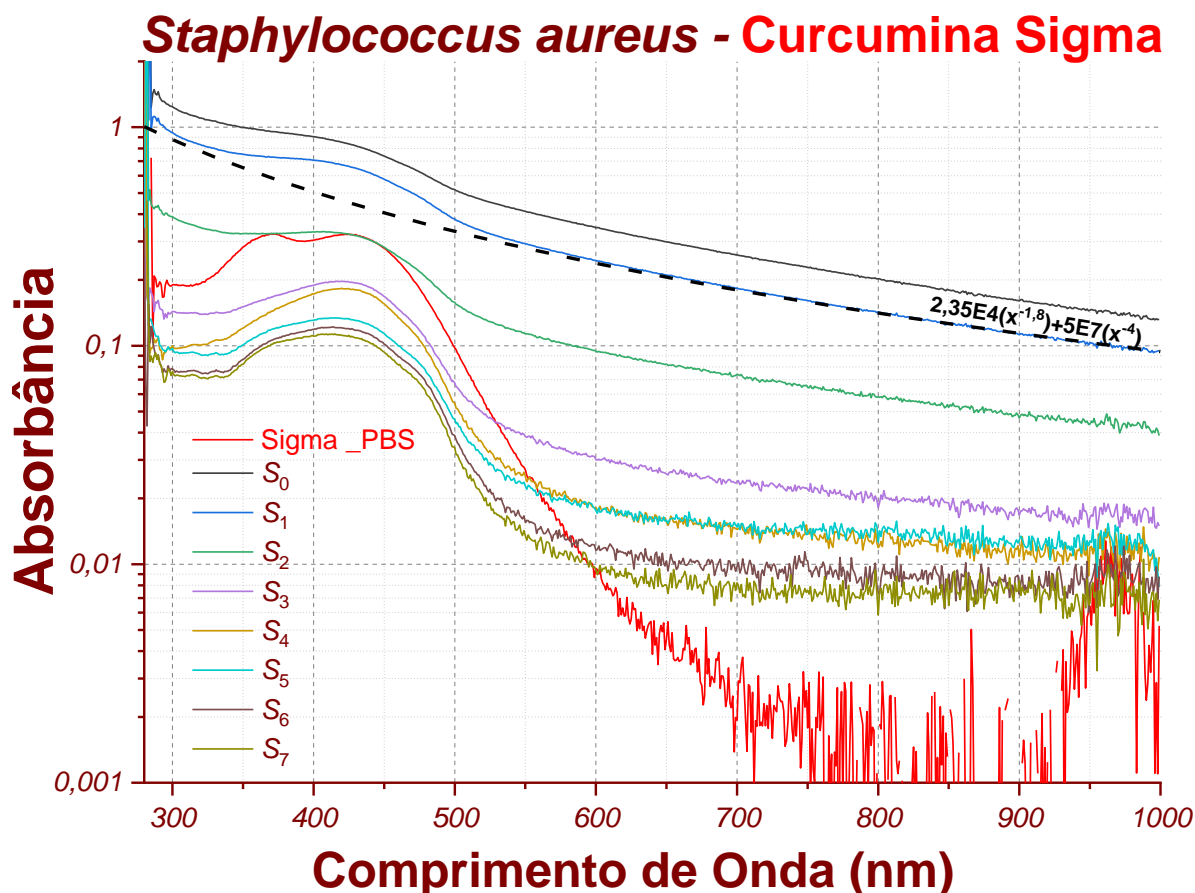


Gráfico 50 Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das médias das triplicatas biológicas das diferentes diluições S referente às diferentes concentrações do sobrenadante do caldo bacteriano lavado da *S. aureus*, com uma alíquota de $3 \mu\text{l}$, em cada uma das diluições S, retiradas das soluções stock de $10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ da curcumina Sigma preparada em solução de etanol, na concentração final de $55,1 \mu\text{M}$ por microtubo de 1,5 ml. Empreende-se que todas as curvas médias apresentam os picos característicos da presença da curcumina Sigma no comprimento de onda de 425 nm, além disso, salienta-se dois diferentes regimes de curvas de absorvância ao considerarmos os espalhamentos para os comprimentos de onda entre 600 nm e 1000 nm. Um característico da bactéria *S. aureus* para as curvas médias S₀, S₁ e S₂, que tem a lei de formação na equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, em que S₁, por exemplo, apresenta a equação $A(\lambda) = 2,35 \times 10^4 \cdot \lambda^{-1,8} + 5,0 \times 10^7 \cdot \lambda^{-4}$ e com espalhamentos característicos de partículas pequenas e índices de λ de $-1,8$ e -4 . Além disso, nota-se que conforme as concentrações do caldo bacteriano lavado vão diminuindo as curvas de absorvância também vão, uma vez que quanto maior for a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes no meio.

Fonte: Elaborado pelo autor

- R. Gráfico do translado vertical das curvas referentes às absorvâncias médias do caldo lavado da *S. aureus* referente às triplicatas biológicas das diluições S com adição da curcumina Sigma

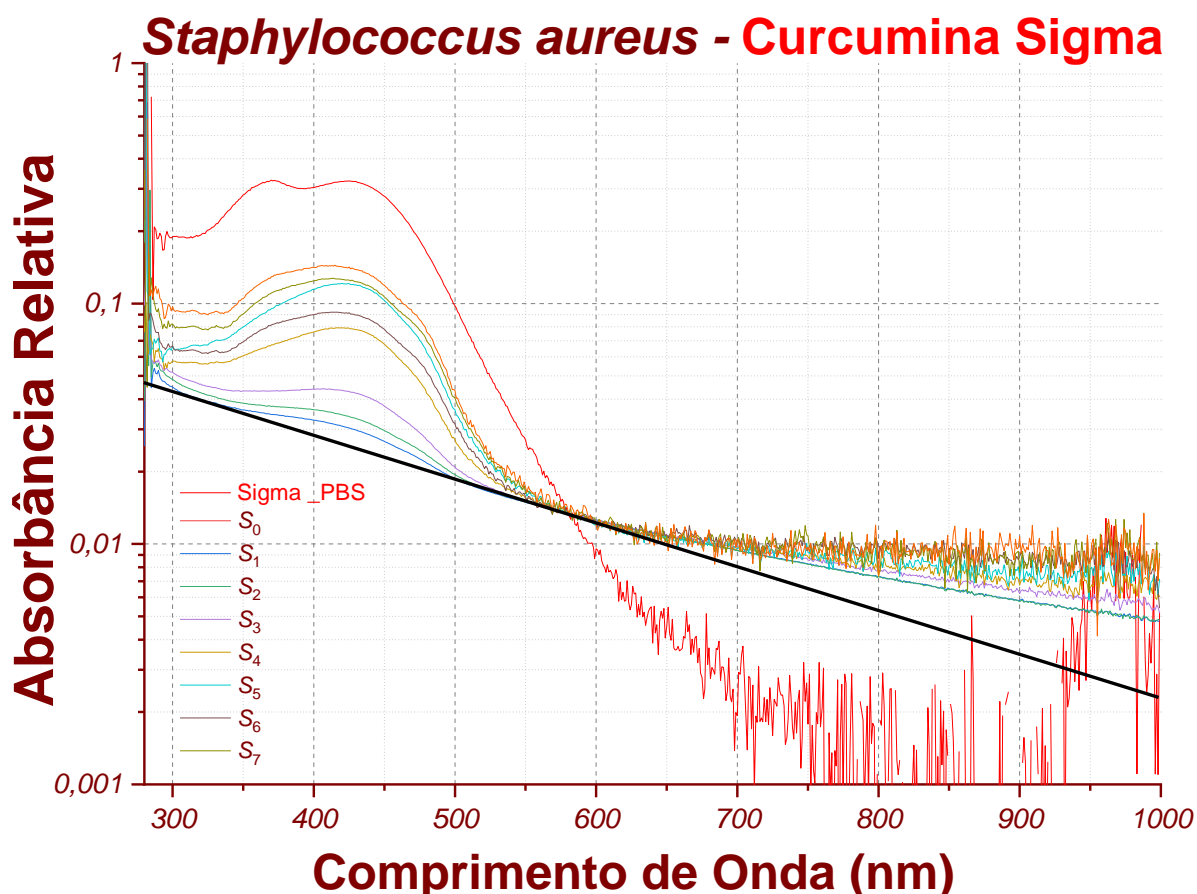


Gráfico 51 Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das curvas médias transladas em relação ao eixo y obtidas do anexo 0. Observa-se que ao realizar o translado das curvas, no comprimento de onda de $580,13 \text{ nm}$ e absorvância de $0,0135$, todas as curvas passam por este ponto específico permitindo-se com isso desprezar o ruído de fundo gerado a partir do comprimento de onda de $580,13 \text{ nm}$ para as futuras análises, por se tratar de uma região em que o espalhamento se deve à formação de *clusters* e aglomerados particulares como tratado no subcapítulo 5.1 Caracterização óptica das curcuminas. Além disso, tem-se que ao transladar essas curvas há uma inversão do posicionamento de cada uma delas em relação à originalmente traçada. Note que a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_0 que aparecia em primeiro, de cima para baixo, no anexo 0, agora aparece em último, sendo a mais próxima da curva de referência, e a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_7 que aparecia em último, de cima para baixo, no anexo 0, agora está em primeiro, ou seja, em relação à reta de referência esta é a mais distante.

Fonte: Elaborado pelo autor.

S. Gráfico analítico percentual dos picos em 425 nm das curvas transladadas das absorbâncias médias do caldo lavado da *S. aureus* referente às triplicatas biológicas das diluições S e com adição da curcumina Sigma

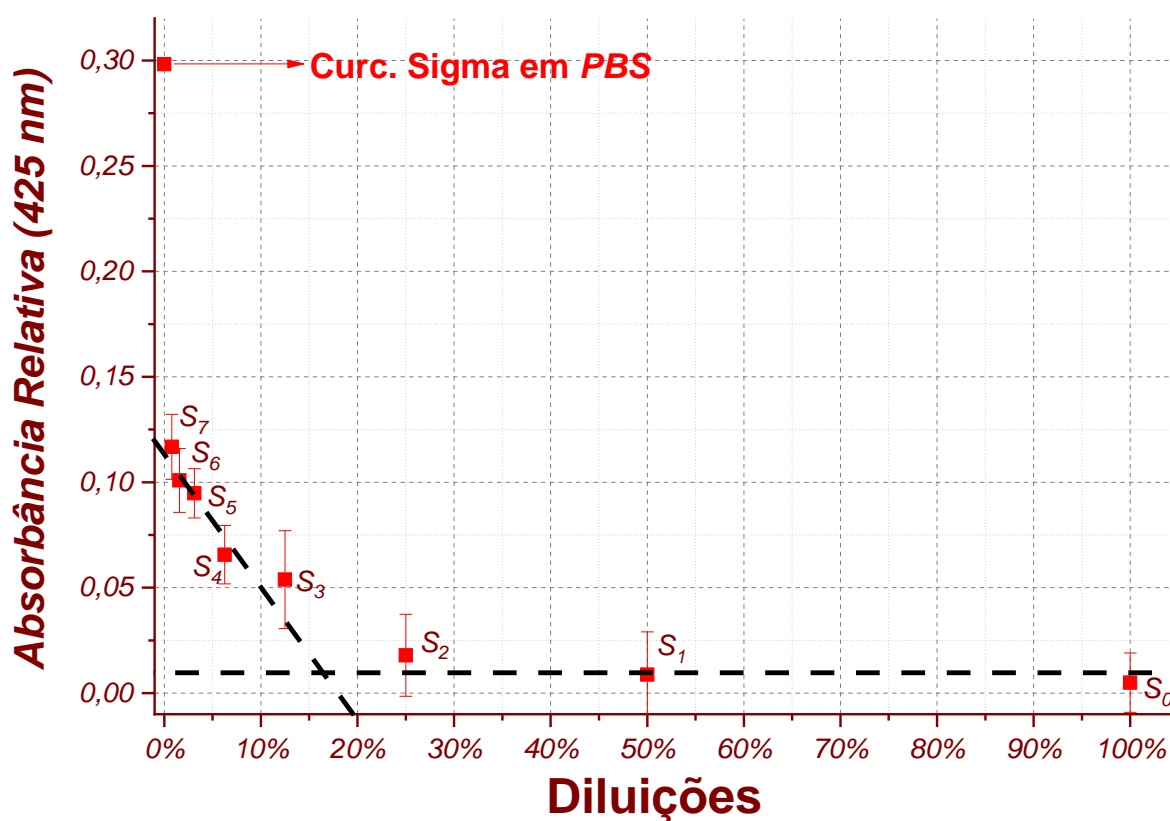


Gráfico 52 - Monologarítmo resultante da análise dos picos, no comprimento de onda de 425 nm, das curvas transladadas apresentadas no Gráfico 51. Observa-se dois regimes significativos em relação ao comportamento da quantidade de curcumina Sigma que interagiu com a *S. aureus*, que estão representados pelas retas tracejadas em preto. A curva (a) mostra um regime de acentuado de crescimento da absorbância relativa referente à curcumina livre no sobrenadante a partir da diluição S₃ e até a diluição S₇. A curva (b) apresenta uma pequena variação da quantidade de curcumina Sigma livre no meio, apresentada pela variação da absorbância de 0,005 até 0,05, entre as diluições S₀ e S₃.

Fonte: Elaborado pelo autor

T. Gráfico relativo da Concentração molar da curcumina Sigma livre no sobrenadante dos picos em 425 nm das curvas transladadas das absorbâncias médias do caldo lavado da *S. aureus* referente às triplicatas biológicas das diluições S pelo relativo UFC médio / ml

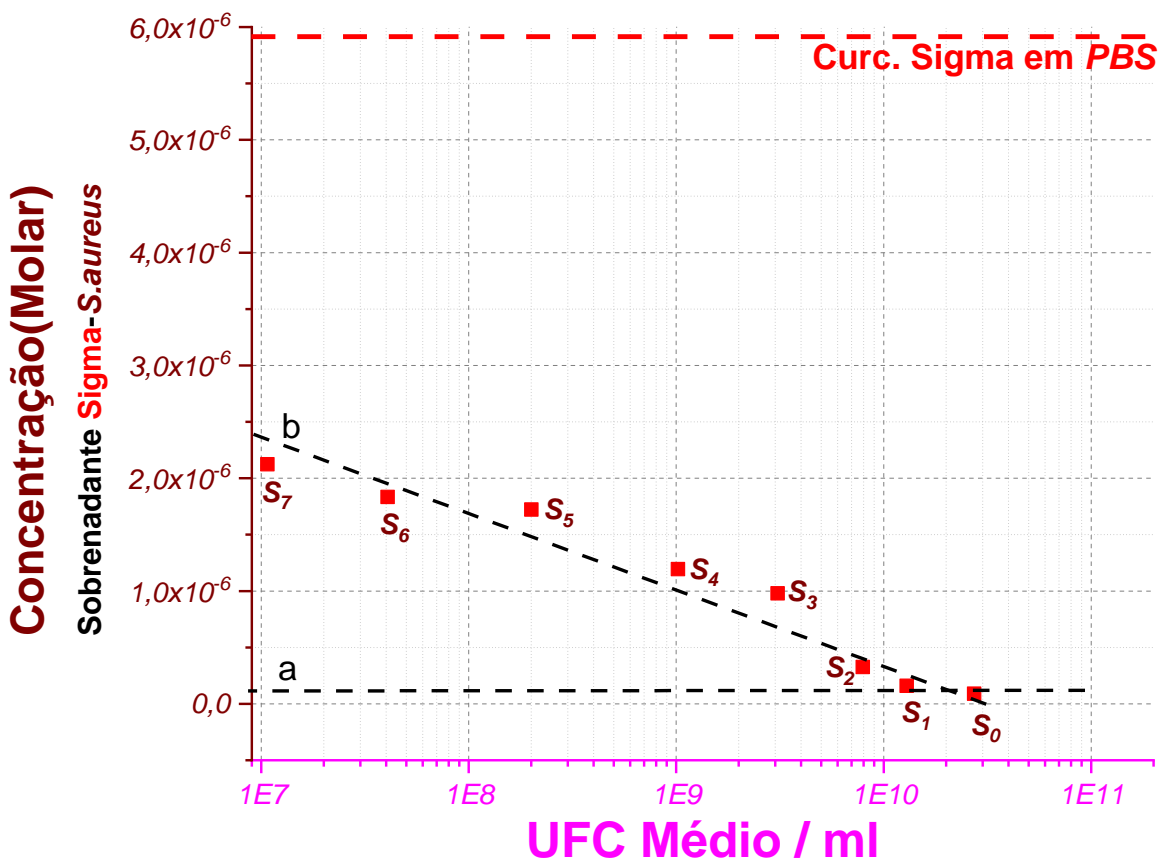


Gráfico 53 Monologarímetro construído com as informações do Gráfico 42, para o eixo das ordenadas obtido pela correlação das absorbâncias relativas no comprimento de onda de 425 nm do sobrenadante contendo curcumina Sigma livre com a concentração molar do Gráfico 1-b, e o eixo das abscissas obtido pelas informações do Gráfico 48, apêndice 0. Evidenciam-se dois regimes para as diferentes concentrações molares de curcumina Sigma livre que estão representados pelas linhas tracejadas em preto. A curva (a) representa uma pequena variação da concentração molar da curcumina livre do sobrenadante de, aproximadamente, 0,09 μM , S₀, para 0,98 μM , S₃, em uma variação de UFC médio / ml de $2,73 \times 10^{10}$ para $3,09 \times 10^9$, respectivamente, de S₀ para S₃. A curva (b) mostra uma grande variação da concentração molar da curcumina Sigma livre no sobrenadante de, aproximadamente, 0,98 μM em S₃ para 2,12 μM em S₇, acompanhada por certa linearidade pela variação do UFC médio / ml de $3,09 \times 10^9$ em S₃ para $1,07 \times 10^7$ em S₇.

Fonte: Elaborado pelo autor

U. Gráfico das absorvâncias médias do caldo lavado da *S. aureus* referente às triplicatas biológicas das diluições S com adição da curcumina Natural

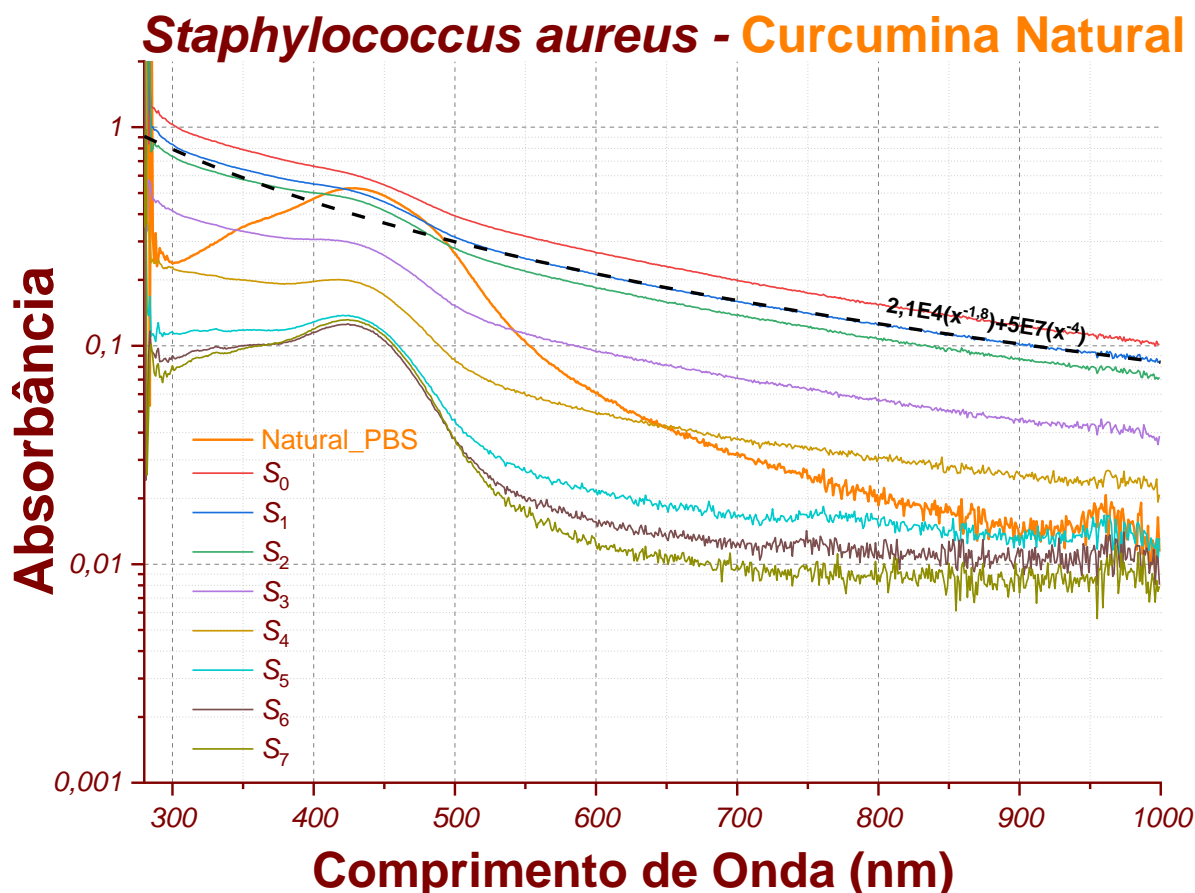


Gráfico 54 Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das médias das triplicatas biológicas das diferentes diluições S referente às diferentes concentrações do sobrenadante do caldo bacteriano lavado da *S. aureus*, com uma alíquota de $3 \mu\text{l}$, em cada uma das diluições S, retiradas das soluções stock de $10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ da curcumina Natural preparada em solução de etanol, na concentração final de $55,1 \mu\text{M}$ por microtubo de 1,5 ml. Empreende-se que todas as curvas médias apresentam os picos característicos da presença da curcumina Natural no comprimento de onda de 425 nm, além disso, salienta-se dois diferentes regimes de curvas de absorvância ao considerarmos os espalhamentos para os comprimentos de onda entre 600 nm e 1000 nm. Um característico da bactéria *S. aureus* para as curvas médias S₀, S₁ e S₂, que tem a lei de formação na equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, em que S₁, por exemplo, apresenta a equação $A(\lambda) = 2,1 \times 10^4 \cdot \lambda^{-1,8} + 5,0 \times 10^7 \cdot \lambda^{-4}$ e com espalhamentos característicos de partículas pequenas e índices de λ de $-1,8$ e -4 . Além disso, nota-se que conforme as concentrações do caldo bacteriano lavado vão diminuindo as curvas de absorvância também vão, uma vez que quanto maior for a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes no meio.

Fonte: Elaborado pelo autor

V. Gráfico do translado vertical das curvas referentes às absorbâncias médias do caldo lavado da *S. aureus* referente às triplicatas biológicas das diluições S com adição da curcumina Natural

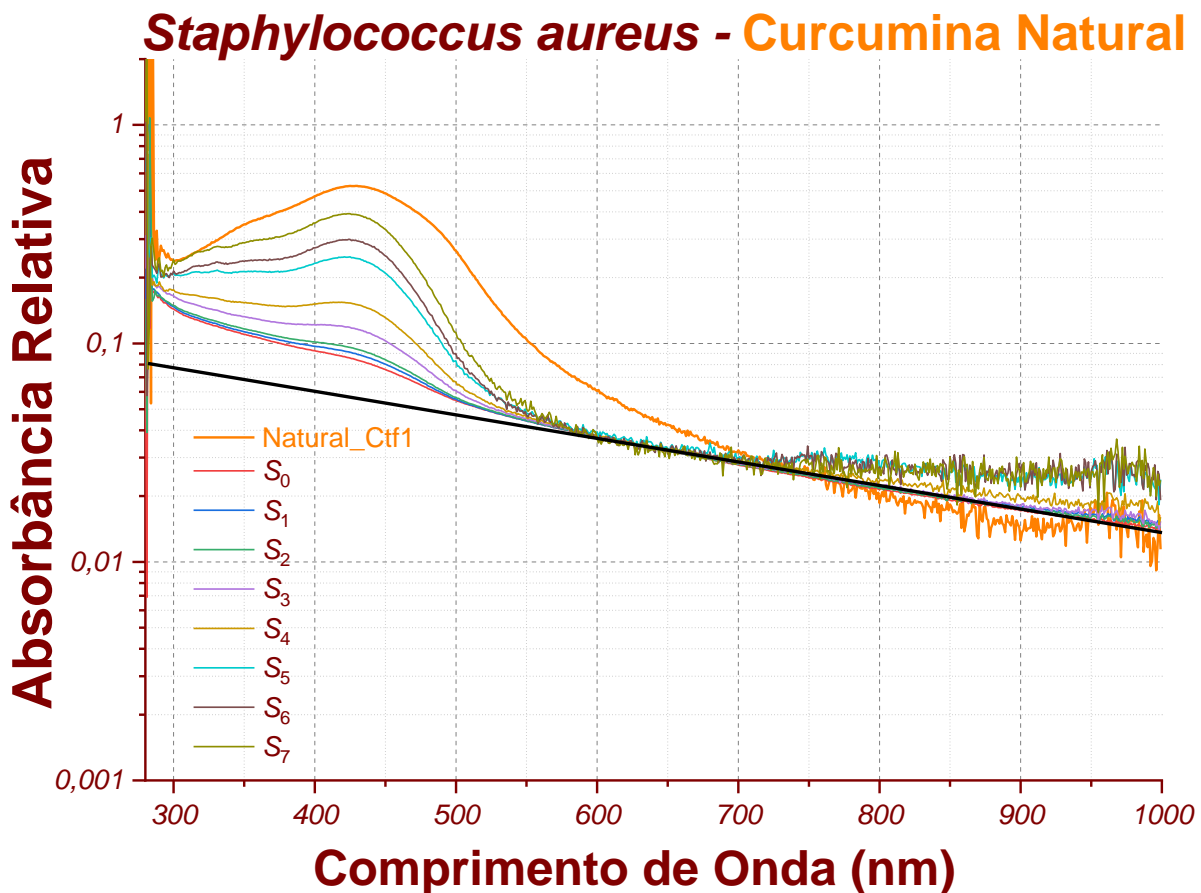


Gráfico 55 Monologarítmo dos espectros de absorbância na região espectral UV-Vis das curvas médias transladas em relação ao eixo y obtidas do anexo 0. Observa-se que ao realizar o translado das curvas, no comprimento de onda de $720,79 \text{ nm}$ e absorbância de $0,0273$, todas as curvas passam por este ponto específico permitindo-se com isso desprezar o ruído de fundo gerado a partir do comprimento de onda de $720,79 \text{ nm}$ para as futuras análises, por se tratar de uma região em que o espalhamento se deve à formação de *clusters* e aglomerados particulares como tratado no subcapítulo 5.1 Caracterização óptica das curcuminas. Além disso, tem-se que ao transladar essas curvas há uma inversão do posicionamento de cada uma delas em relação à originalmente traçada. Note que a curva referente às absorbâncias médias da diluição S_0 que aparecia em primeiro, de cima para baixo, no anexo 0, agora aparece em último, sendo a mais próxima da curva de referência, e a curva referente às absorbâncias médias da diluição S_7 que aparecia em último, de cima para baixo, no anexo 0, agora está em primeiro, ou seja, em relação à reta de referência esta é a mais distante.

Fonte: Elaborado pelo autor.

W. Gráfico analítico percentual dos picos em 425 nm das curvas transladadas das absorvâncias médias do caldo lavado da *S. aureus* referente às triplicatas biológicas das diluições S e com adição da curcumina Natural

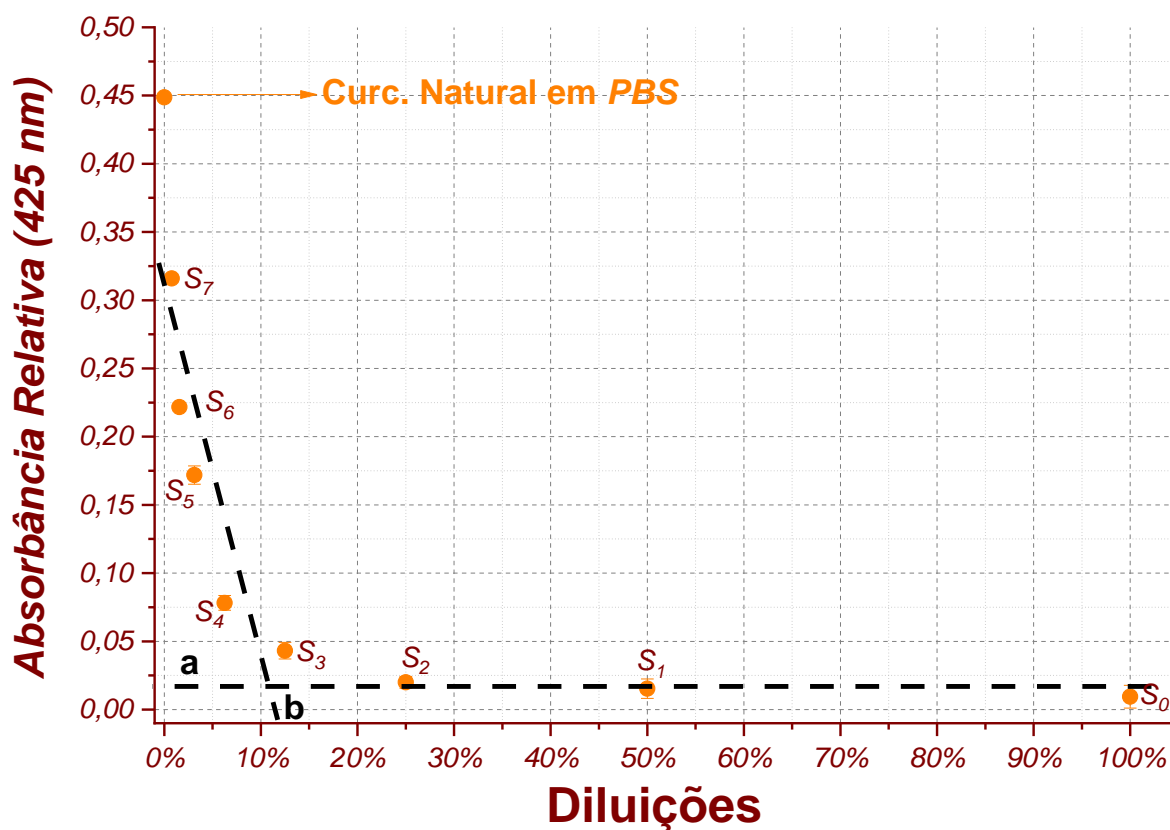


Gráfico 56 Monologarítmo resultante da análise dos picos, no comprimento de onda de 425 nm, das curvas transladadas apresentadas no Gráfico 51. Observa-se dois regimes significativos em relação ao comportamento da quantidade de curcumina Sigma que interagiu com a *S. aureus*, que estão representados pelas retas tracejadas em preto. A curva (a) mostra um regime de acentuado de crescimento da absorbância relativa referente à curcumina livre no sobrenadante a partir da diluição S₃ e até a diluição S₇. A curva (b) apresenta uma pequena variação da quantidade de curcumina Sigma livre no meio, apresentada pela variação da absorbância de 0,009 até 0,04, entre as diluições S₀ e S₃.

Fonte: Elaborado pelo autor

X. Gráfico relativo da Concentração molar da curcumina Natural livre no sobrenadante dos picos em 425 nm das curvas transladadas das absorvâncias médias do caldo lavado da *S. aureus* referente às triplicatas biológicas das diluições S pelo relativo UFC médio / ml

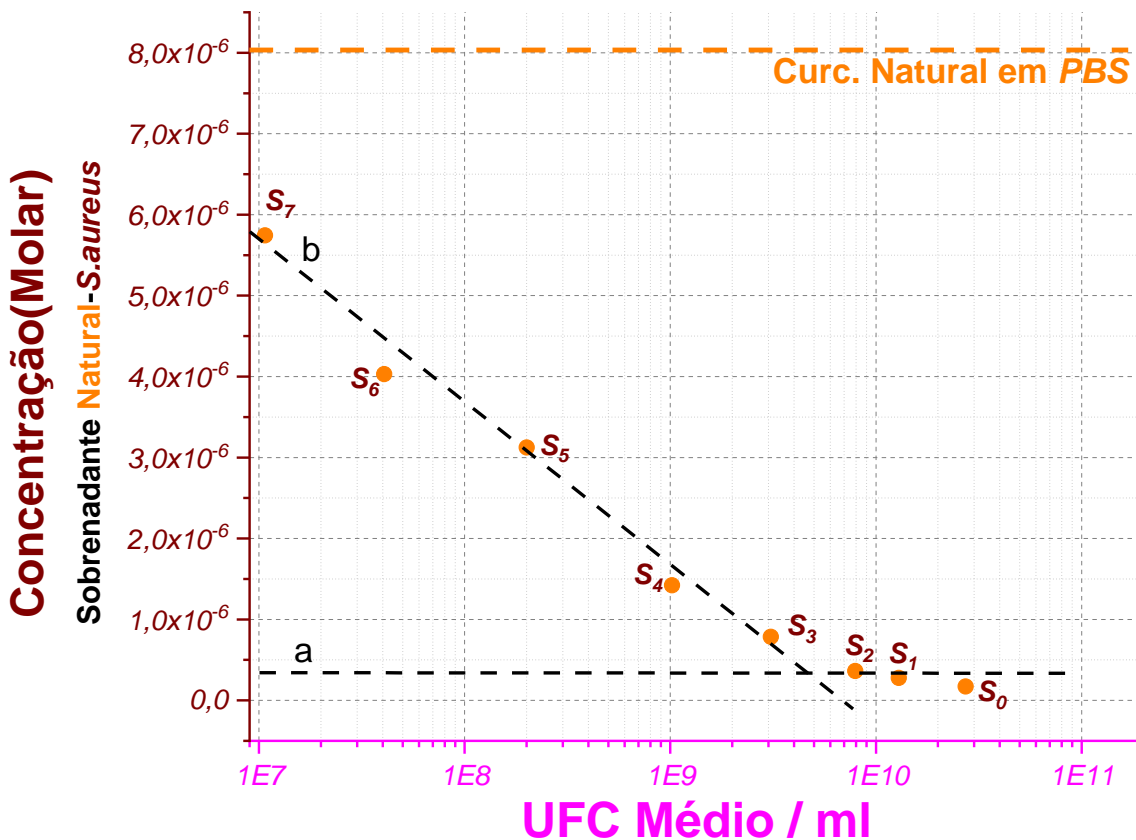


Gráfico 57 Monologarítmico construído com as informações do Gráfico 56, para o eixo das ordenadas obtido pela correlação das absorvâncias relativas no comprimento de onda de 425 nm do sobrenadante contendo curcumina Natural livre com a concentração molar do Gráfico 1-b, e o eixo das abscissas obtido pelas informações do Gráfico 48, apêndice 0. Evidenciam-se dois regimes para as diferentes concentrações molares de curcumina Natural livre que estão representados pelas linhas tracejadas em preto. A curva (a) representa uma pequena variação da concentração molar da curcumina livre do sobrenadante de, aproximadamente, 0,16 μM , S₀, para 0,78 μM , S₃, em uma variação de UFC médio / ml de $2,73 \times 10^{10}$ para $3,09 \times 10^9$, respectivamente, de S₀ para S₃. A curva (b) mostra uma grande variação da concentração molar da curcumina Natural livre no sobrenadante de, aproximadamente, 0,78 μM em S₃ para 5,73 μM em S₇, acompanhada por certa linearidade pela variação do UFC médio / ml de $3,09 \times 10^9$ em S₃ para $1,07 \times 10^7$ em S₇.

Fonte: Elaborado pelo autor

Y. Gráfico das absorvâncias médias do caldo lavado da *S. aureus* referente às triplicatas biológicas das diluições S com adição da curcumina Sintética

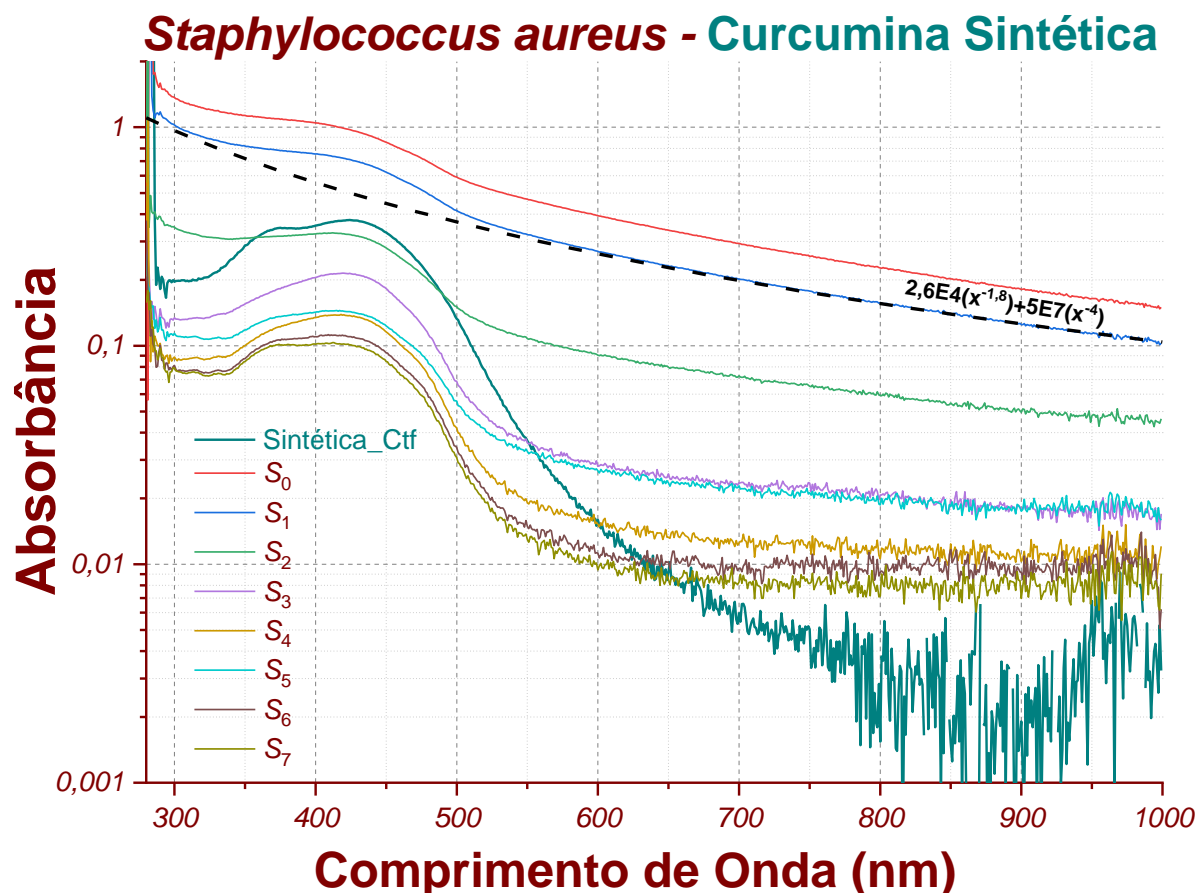


Gráfico 58 Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das médias das triplicatas biológicas das diferentes diluições S referente às diferentes concentrações do sobrenadante do caldo bacteriano lavado da *S. aureus*, com uma alíquota de $3 \mu\text{l}$, em cada uma das diluições S, retiradas das soluções stock de $10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ da curcumina Sintética preparada em solução de etanol, na concentração final de $55,1 \mu\text{M}$ por microtubo de 1,5 ml. Empreende-se que todas as curvas médias apresentam os picos característicos da presença da curcumina Sintética no comprimento de onda de 425 nm, além disso, salienta-se dois diferentes regimes de curvas de absorvância ao considerarmos os espalhamentos para os comprimentos de onda entre 600 nm e 1000 nm. Um característico da bactéria *S. aureus* para as curvas médias S₀, S₁ e S₂, que tem a lei de formação na equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, em que S₁, por exemplo, apresenta a equação $A(\lambda) = 2,6 \times 10^4 \cdot \lambda^{-1,8} + 5,0 \times 10^7 \cdot \lambda^{-4}$ e com espalhamentos característicos de partículas pequenas e índices de λ de $-1,8$ e -4 . Além disso, nota-se que conforme as concentrações do caldo bacteriano lavado vão diminuindo as curvas de absorvância também vão, uma vez que quanto maior for a diluição menor será a quantidade de organismos presentes no meio.

Fonte: Elaborado pelo autor

Z. Gráfico do translado vertical das curvas referentes às absorvâncias médias do caldo lavado da *S. aureus* referente às triplicatas biológicas das diluições S com adição da curcumina Sintética

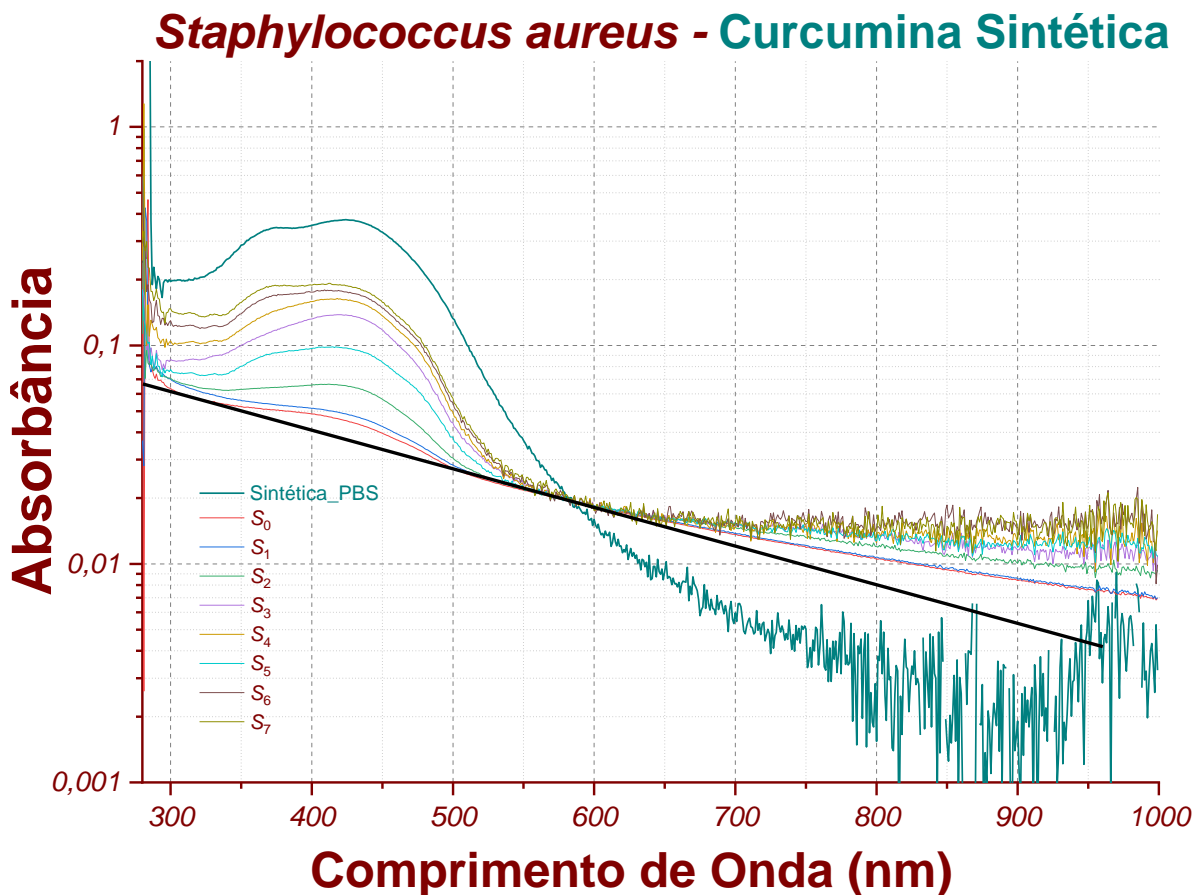


Gráfico 59 Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das curvas médias transladas em relação ao eixo y obtidas do anexo 0. Observa-se que ao realizar o translado das curvas, no comprimento de onda de $585,15 \text{ nm}$ e absorvância de $0,0197$, todas as curvas passam por este ponto específico permitindo-se com isso desprezar o ruído de fundo gerado a partir do comprimento de onda de $585,15 \text{ nm}$ para as futuras análises, por se tratar de uma região em que o espalhamento se deve à formação de *clusters* e aglomerados particulares como tratado no subcapítulo 5.1 Caracterização óptica das curcuminas. Além disso, tem-se que ao transladar essas curvas há uma inversão do posicionamento de cada uma delas em relação à originalmente traçada. Note que a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_0 que aparecia em primeiro, de cima para baixo, no anexo 0, agora aparece em último, sendo a mais próxima da curva de referência, e a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_7 que aparecia em último, de cima para baixo, no anexo 0, agora está em primeiro, ou seja, em relação à reta de referência esta é a mais distante.

Fonte: Elaborado pelo autor.

AA. Gráfico analítico percentual dos picos em 425 nm das curvas transladadas das absorbâncias médias do caldo lavado da *S. aureus* referente às triplicatas biológicas das diluições S e com adição da curcumina Sintética

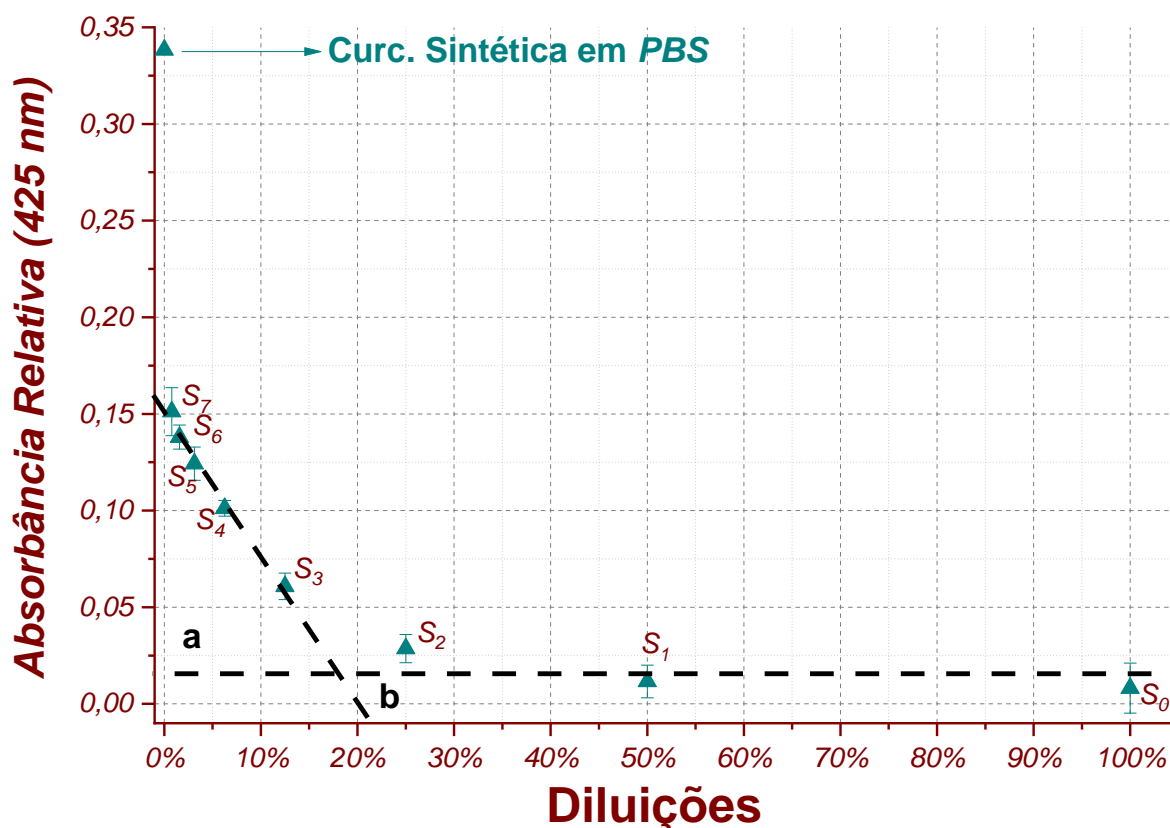


Gráfico 60 Monologarítmo resultante da análise dos picos, no comprimento de onda de 425 nm, das curvas transladadas apresentadas no Gráfico 59. Observa-se dois regimes significativos em relação ao comportamento da quantidade de curcumina Sintética que interagiu com a *S.aureus*, que estão representados pelas retas tracejadas em preto. A curva (a) mostra um regime de acentuado de crescimento da absorbância relativa referente à curcumina livre no sobrenadante a partir da diluição S₃ e até a diluição S₇. A curva (b) apresenta uma pequena variação da quantidade de curcumina Sigma livre no meio, apresentada pela variação da absorbância de 0,007 até 0,06, entre as diluições S₀ e S₃.

Fonte: Elaborado pelo autor

BB. Gráfico relativo da Concentração molar da curcumina Sintética livre no sobrenadante dos picos em 425 nm das curvas transladadas das absorvâncias médias do caldo lavado da *S. aureus* referente às triplicatas biológicas das diluições S pelo relativo UFC médio / ml

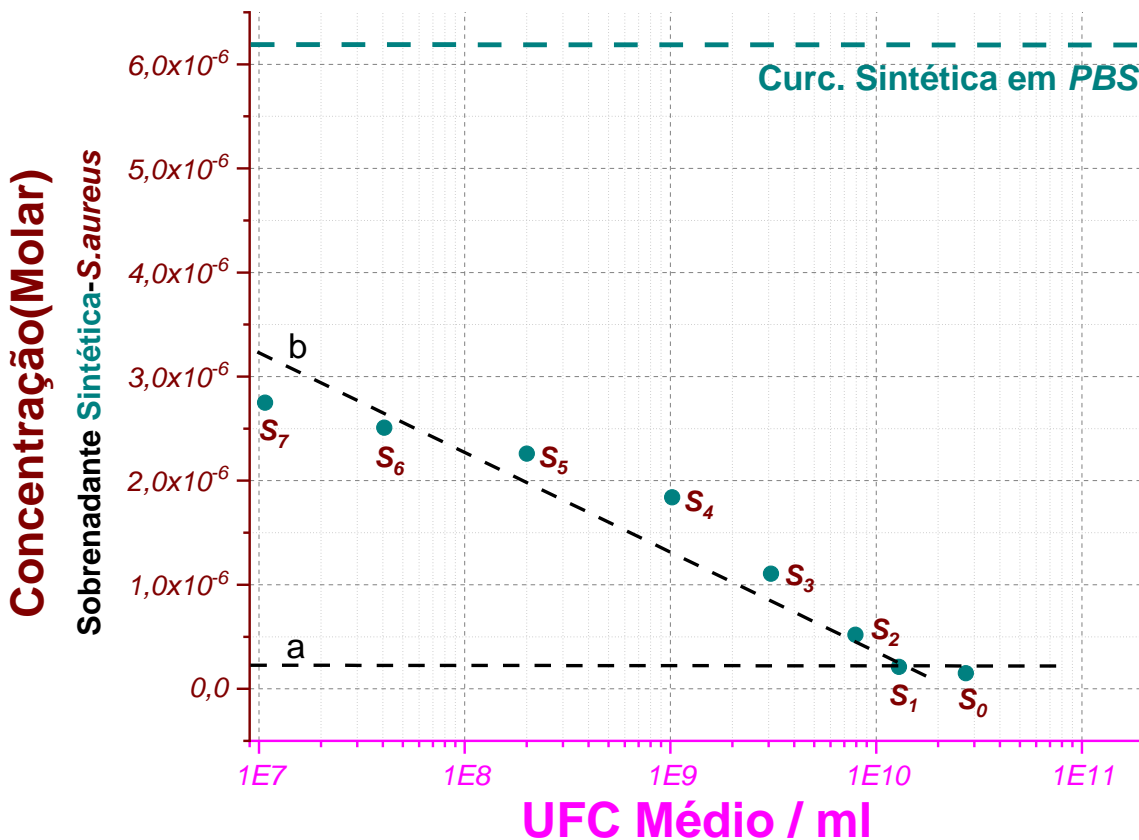


Gráfico 61 Monologarítmo construído com as informações do Gráfico 60, para o eixo das ordenadas obtido pela correlação das absorvâncias relativas no comprimento de onda de 425 nm do sobrenadante contendo curcumina Sintética livre com a concentração molar do Gráfico 1-b, e o eixo das abscissas obtido pelas informações do Gráfico 48, apêndice 0. Evidenciam-se dois regimes para as diferentes concentrações molares de curcumina Sintética livre que estão representados pelas linhas tracejadas em preto. A curva (a) representa uma pequena variação da concentração molar da curcumina livre do sobrenadante de, aproximadamente, 0,14 μM, S₀, para 0,48 μM, S₃, em uma variação de UFC médio / ml de 2,73 × 10¹⁰ para 3,09 × 10⁹, respectivamente, de S₀ para S₂. A curva (b) mostra uma grande variação da concentração molar da curcumina Sintética livre no sobrenadante de, aproximadamente, 0,48 μM em S₂ para 2,74 μM em S₇, acompanhada por certa linearidade pela variação do UFC médio / ml de 3,09 × 10⁹ em S₃ para 1,07 × 10⁷ em S₇.

Fonte: Elaborado pelo autor

CC. Gráfico das correspondências estabelecidas entre as absorbâncias médias do sobrenadante dos caldos lavados da *S. mutans* nos comprimentos de onda de 425 nm e 600 nm e o UFC médio / ml referente às diluições do tipo S.

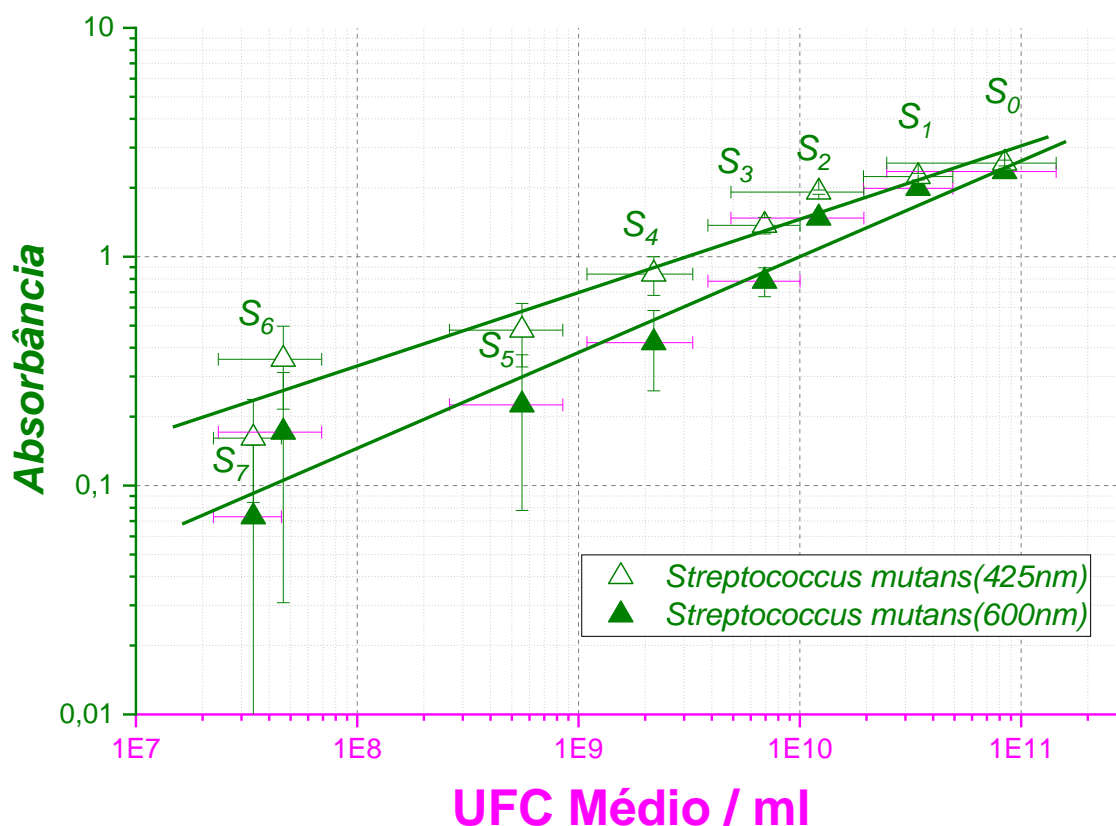


Gráfico 62 Logaritmo que estabelece a relação direta entre as medidas médias das quadruplas de absorbância e o *UFC médio / ml* trabalhado com a bactéria *Streptococcus mutans*. Para construir este gráfico os dados foram retirados dos Gráfico 36 e Gráfico 37. Observa-se uma relação linear entre as médias das medidas de absorbância tanto em 600 nm quanto em 425 nm e *UFC / ml*, estabelecendo assim uma forma indireta de contagem de células viáveis e a medida de absorbância para esta cepa nestes dois comprimentos de onda.

Fonte: Elaborado pelo autor.

DD. Gráfico das absorvâncias médias do caldo lavado da *S. mutans* referente às triplicatas biológicas das diluições *S* obtido por meio do acompanhamento de todos os controles sem a adição de curcumina

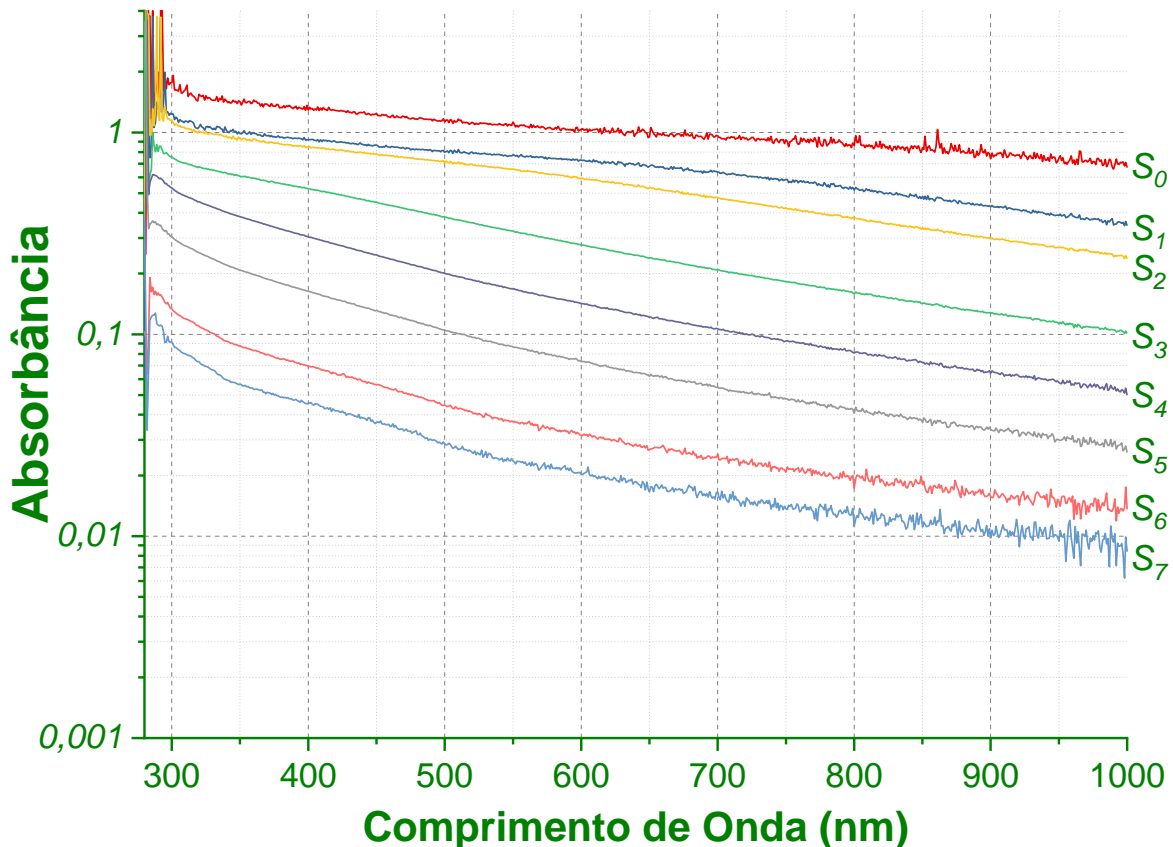


Gráfico 63 Monologarítmo dos espectros de Absorbância na região espectral UV-Vis das médias das medidas de absorbância das triplicatas biológicas da *S. mutans* submetido a uma série de 7 diluições sequenciais de 50 %, sendo a primeira, solução inicial, S_0 , com 100 % da amostra do caldo lavado, a segunda amostra, S_1 , com $\frac{1}{2}$ da S_0 , a terceira amostra, S_2 , com $\frac{1}{4}$ da S_0 , a quarta amostra, S_3 , com $\frac{1}{8}$ da S_0 , a quinta amostra, S_4 , com $\frac{1}{16}$ da S_0 , a sexta amostra, S_5 , com $\frac{1}{32}$ da S_0 , a sétima amostra, S_6 , com $\frac{1}{64}$ da S_0 , e por fim, a oitava amostra, S_7 , com $\frac{1}{128}$ da S_0 . Empreende-se deste gráfico que as curvas referentes às diluições seguem a equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$ apresentada para espalhamentos característicos de partículas pequenas com índices de λ de $-1,7$ e de -4 . Observa-se que conforme a diluição do caldo lavado aumenta a curva de absorbância diminui, uma característica já esperada, ao passo que quanto maior a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes na solução.

Fonte: Elaborado pelo autor

EE. Gráfico das absorvâncias médias do caldo lavado da *S. mutans* referente às triplicatas biológicas das diluições S com adição da curcumina Sigma

Streptococcus mutans - Curcumina Sigma

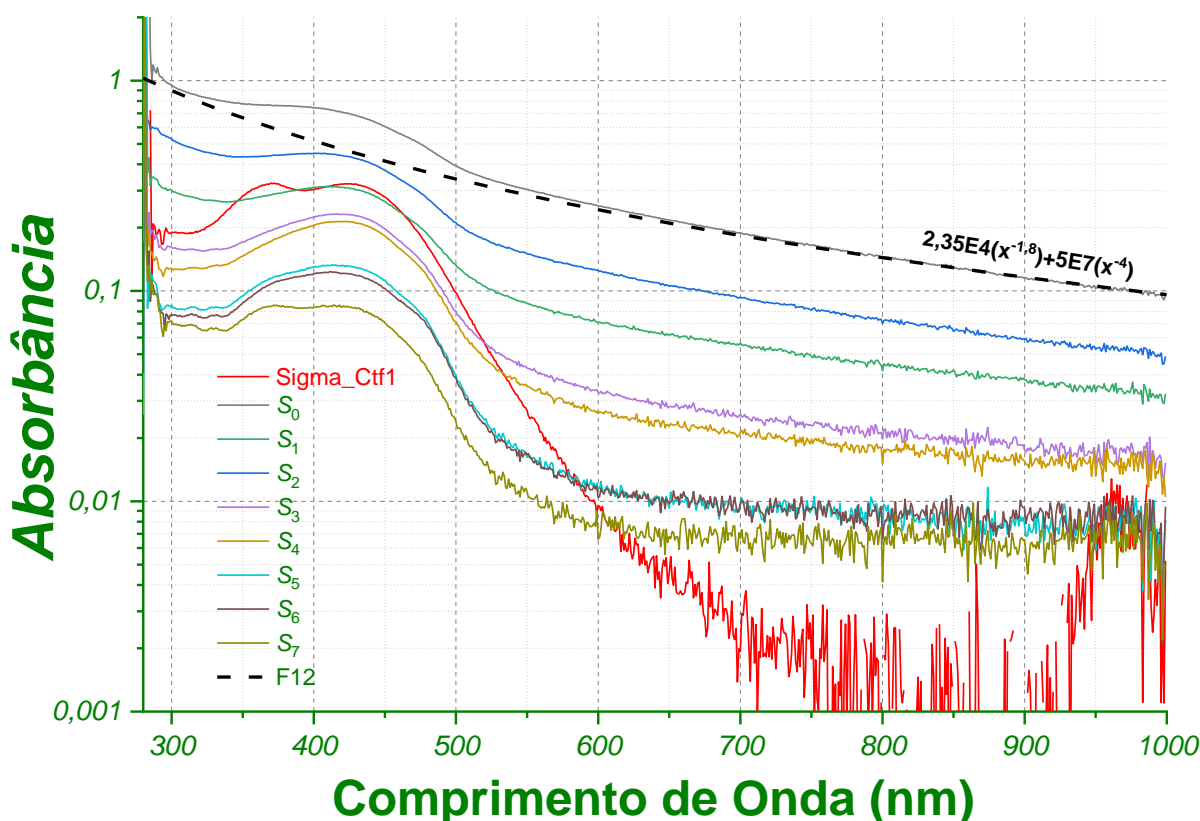


Gráfico 64 Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das médias das triplicatas biológicas das diferentes diluições S referente às diferentes concentrações do sobrenadante do caldo bacteriano lavado da *S. mutans*, com uma alíquota de $3 \mu\text{l}$, em cada uma das diluições S, retiradas das soluções stock de $10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ da curcumina Sigma preparada em solução de etanol, na concentração final de $55,1 \mu\text{M}$ por microtubo de 1,5 ml. Empreende-se que todas as curvas médias apresentam os picos característicos da presença da curcumina Sigma no comprimento de onda de 425 nm, além disso, salienta-se dois diferentes regimes de curvas de absorvância ao considerarmos os espalhamentos para os comprimentos de onda entre 600 nm e 1000 nm. Um característico da bactéria *S. aureus* para as curvas médias S_0 , S_1 e S_2 , que tem a lei de formação na equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, em que S_1 , por exemplo, apresenta a equação $A(\lambda) = 2,4 \times 10^4 \cdot \lambda^{-1,8} + 5,0 \times 10^7 \cdot \lambda^{-4}$ e com espalhamentos característicos de partículas pequenas e índices de λ de $-1,8$ e -4 . Além disso, nota-se que conforme as concentrações do caldo bacteriano lavado vão diminuindo as curvas de absorvância também vão, uma vez que quanto maior for a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes no meio.

Fonte: Elaborado pelo autor

FF. Gráfico do translado vertical das curvas referentes às absorvâncias médias do caldo lavado da *S. mutans* referente às triplicatas biológicas das diluições S com adição da curcumina Sigma

Streptococcus mutans - Curcumina Sigma

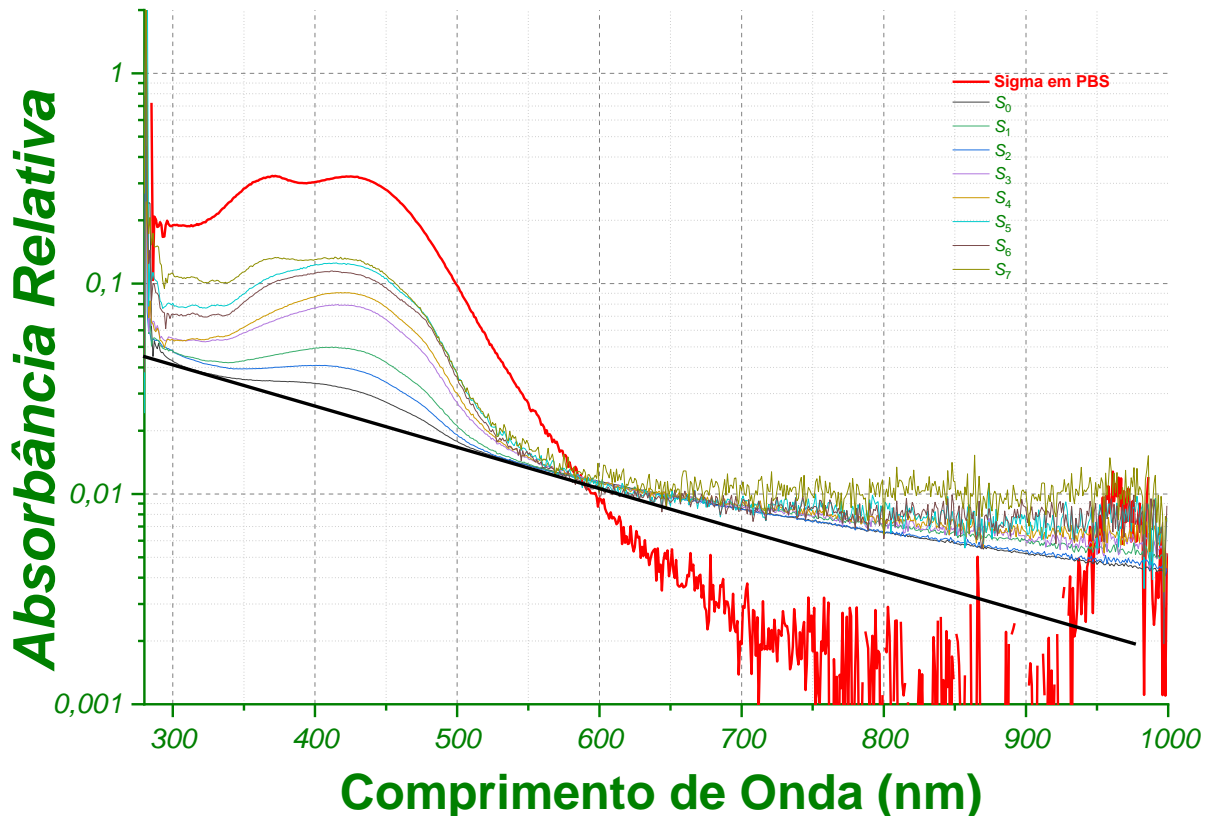


Gráfico 65 Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das curvas médias transladas em relação ao eixo y obtidas do anexo FF. Observa-se que ao realizar o translado das curvas, no comprimento de onda de 588,10 nm e absorvância de 0,012, todas as curvas passam por este ponto específico permitindo-se com isso desprezar o ruído de fundo gerado a partir do comprimento de onda de 588,10 nm para as futuras análises, por se tratar de uma região em que o espalhamento se deve à formação de *clusters* e aglomerados particulares como tratado no subcapítulo 5.1 Caracterização óptica das curcuminas. Além disso, tem-se que ao transladar essas curvas há uma inversão do posicionamento de cada uma delas em relação à originalmente traçada. Note que a curva referente às absorvâncias médias da diluição S₀ que aparecia em primeiro, de cima para baixo, no anexo FF, agora aparece em último, sendo a mais próxima da curva de referência, e a curva referente às absorvâncias médias da diluição S₇ que aparecia em último, de cima para baixo, no anexo FF, agora está em primeiro, ou seja, em relação à reta de referência esta é a mais distante.

Fonte: Elaborado pelo autor.

GG. Gráfico analítico percentual referente aos picos em 425 nm das curvas transladadas das absorbâncias médias do caldo lavado da *S. mutans* referente às triplicatas biológicas das diluições S e com adição da curcumina Sigma

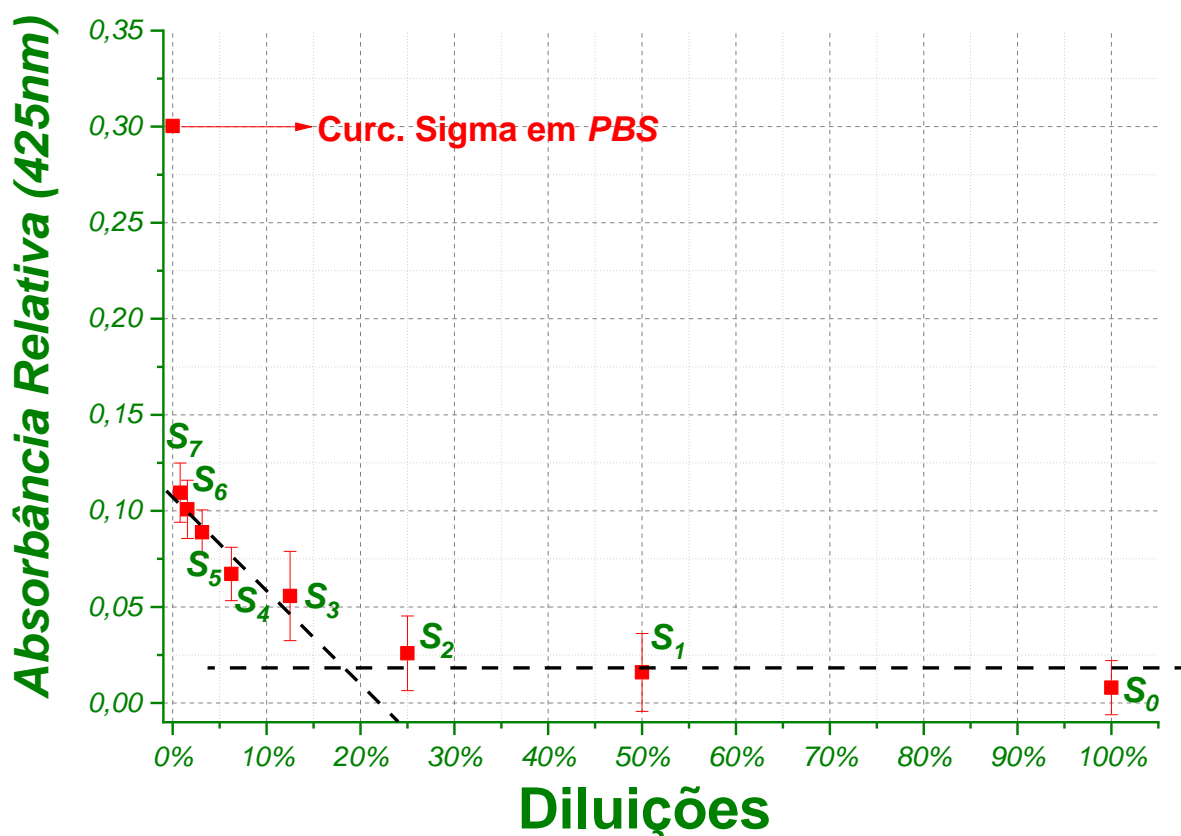


Gráfico 66 Monologarítmo resultante da análise dos picos, no comprimento de onda de 425 nm, das curvas transladadas apresentadas no Gráfico 59. Observa-se dois regimes significativos em relação ao comportamento da quantidade de curcumina Sigma que interagiu com a *S. mutans*, que estão representados pelas retas tracejadas em preto. A curva (a) mostra um regime de acentuado de crescimento da absorbância relativa referente à curcumina livre no sobrenadante a partir da diluição S₃ e até a diluição S₇. A curva (b) apresenta uma pequena variação da quantidade de curcumina Sigma livre no meio, apresentada pela variação da absorbância de 0,007 até 0,06, entre as diluições S₀ e S₃.

Fonte: Elaborado pelo autor

HH. Gráfico relativo da Concentração molar da curcumina Sigma livre no sobrenadante dos picos em 425 nm das curvas transladadas das absorbâncias médias do caldo lavado da *S. mutans* referente às triplicatas biológicas das diluições S pelo relativo UFC médio / ml

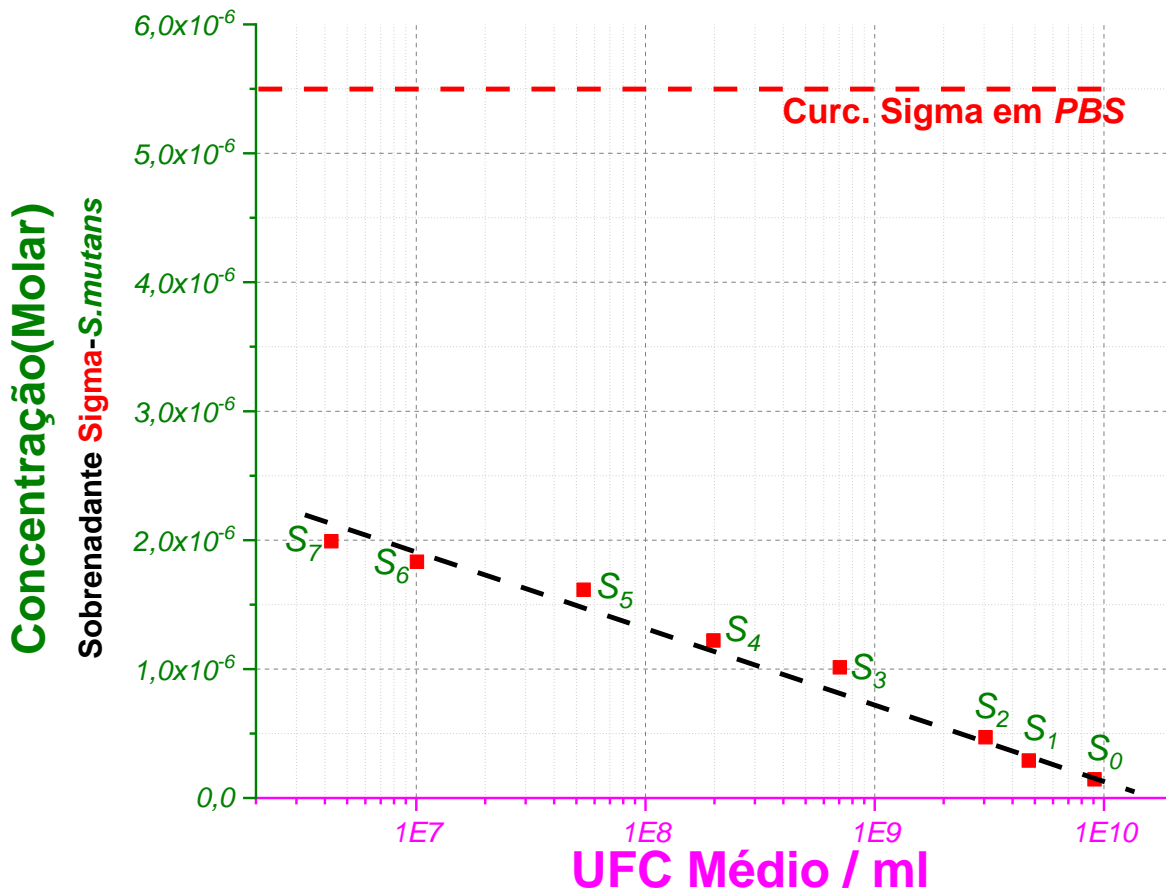


Gráfico 67 Monologarímetro construído com as informações do Gráfico 60, para o eixo das ordenadas obtido pela correlação das absorbâncias relativas no comprimento de onda de 425 nm do sobrenadante contendo curcumina Sintética livre com a concentração molar do Gráfico 1-b, e o eixo das abscissas obtido pelas informações do Gráfico 48, apêndice P. Evidenciam-se um regime linear para as diferentes concentrações molares de curcumina Sigma livre que está representada pela linha tracejada em preto. A concentração molar da curcumina livre do sobrenadante vai de, aproximadamente, 0,14 μM , S₀, para 2,0 μM , S₇, em uma variação de UFC médio / ml de $9,4 \times 10^9$ para $4,3 \times 10^6$, respectivamente, de S₀ para S₇.

Fonte: Elaborado pelo autor

II. Gráfico das absorvâncias médias do caldo lavado da *S. mutans* referente às triplicatas biológicas das diluições S com adição da curcumina Natural

Streptococcus mutans - Curcumina Natural

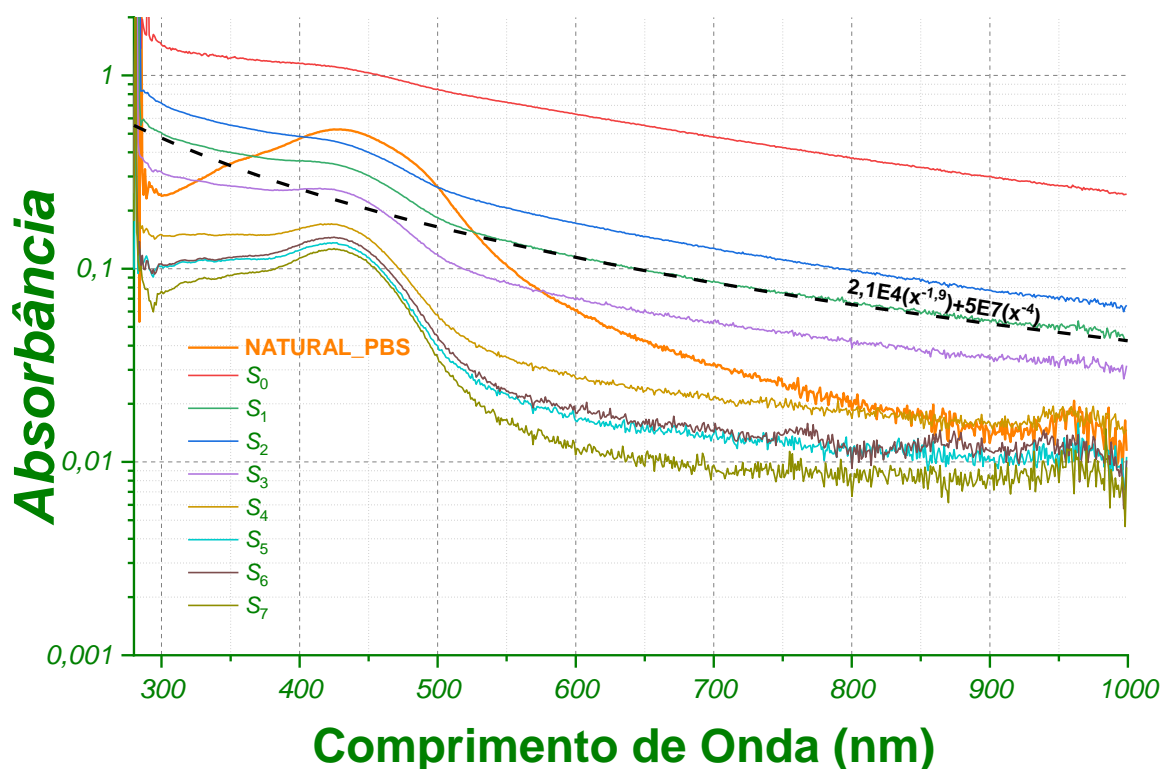


Gráfico 68 Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das médias das triplicatas biológicas das diferentes diluições S referente às diferentes concentrações do sobrenadante do caldo bacteriano lavado da *S. mutans*, com uma alíquota de $3 \mu\text{l}$, em cada uma das diluições S, retiradas das soluções stock de $10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ da curcumina Natural preparada em solução de etanol, na concentração final de $55,1 \mu\text{M}$ por microtubo de 1,5 ml. Empreende-se que todas as curvas médias apresentam os picos característicos da presença da curcumina Natural no comprimento de onda de 425 nm, além disso, salienta-se dois diferentes regimes de curvas de absorvância ao considerarmos os espalhamentos para os comprimentos de onda entre 600 nm e 1000 nm. Um característico da bactéria *S. mutans* para as curvas médias S_0 , S_1 e S_2 , que tem a lei de formação na equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, em que S_1 , por exemplo, apresenta a equação $A(\lambda) = 2,1 \times 10^4 \cdot \lambda^{-1,9} + 5,0 \times 10^7 \cdot \lambda^{-4}$ e com espalhamentos característicos de partículas pequenas e índices de λ de $-1,9$ e -4 . Além disso, nota-se que conforme as concentrações do caldo bacteriano lavado vão diminuindo as curvas de absorvância também vão, uma vez que quanto maior for a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes no meio.

Fonte: Elaborado pelo autor

JJ. Gráfico do translado vertical das curvas referentes às absorvâncias médias do caldo lavado da *S. mutans* referente às triplicatas biológicas das diluições S com adição da curcumina Natural

Streptococcus mutans - Curcumina Natural

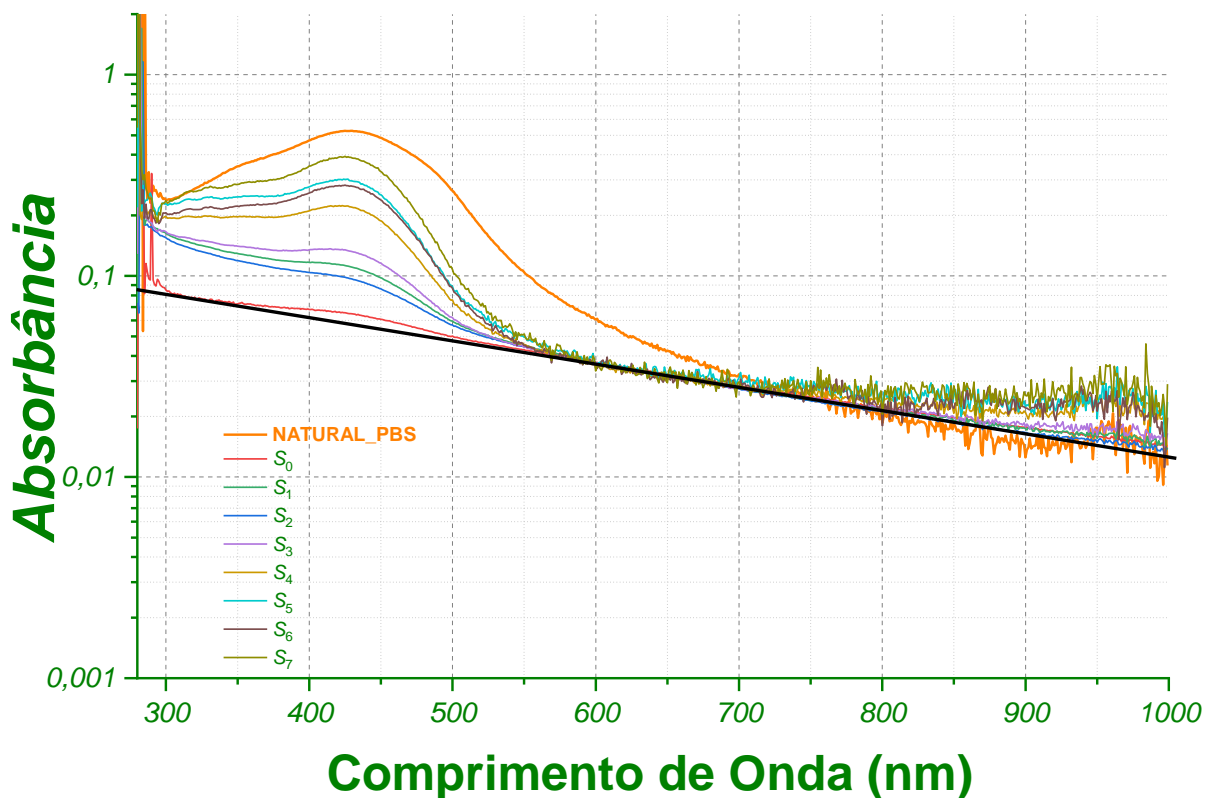


Gráfico 69 Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das curvas médias transladas em relação ao eixo y obtidas do anexo II. Observa-se que ao realizar o translado das curvas, no comprimento de onda de 720,79 nm e absorvância de 0,0273, todas as curvas passam por este ponto específico permitindo-se com isso desprezar o ruído de fundo gerado a partir do comprimento de onda de 720,79 nm para as futuras análises, por se tratar de uma região em que o espalhamento se deve à formação de *clusters* e aglomerados particulares como tratado no subcapítulo 5.1 Caracterização óptica das curcuminas. Além disso, tem-se que ao transladar essas curvas há uma inversão do posicionamento de cada uma delas em relação à originalmente traçada. Note que a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_0 que aparecia em primeiro, de cima para baixo, no anexo II, agora aparece em último, sendo a mais próxima da curva de referência, e a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_7 que aparecia em último, de cima para baixo, no anexo II, agora está em primeiro, ou seja, em relação à reta de referência esta é a mais distante.

Fonte: Elaborado pelo autor.

KK. Gráfico analítico percentual dos picos em 425 nm das curvas transladadas das absorbâncias médias do caldo lavado da *S. mutans* referente às triplicatas biológicas das diluições S e com adição da curcumina Natural

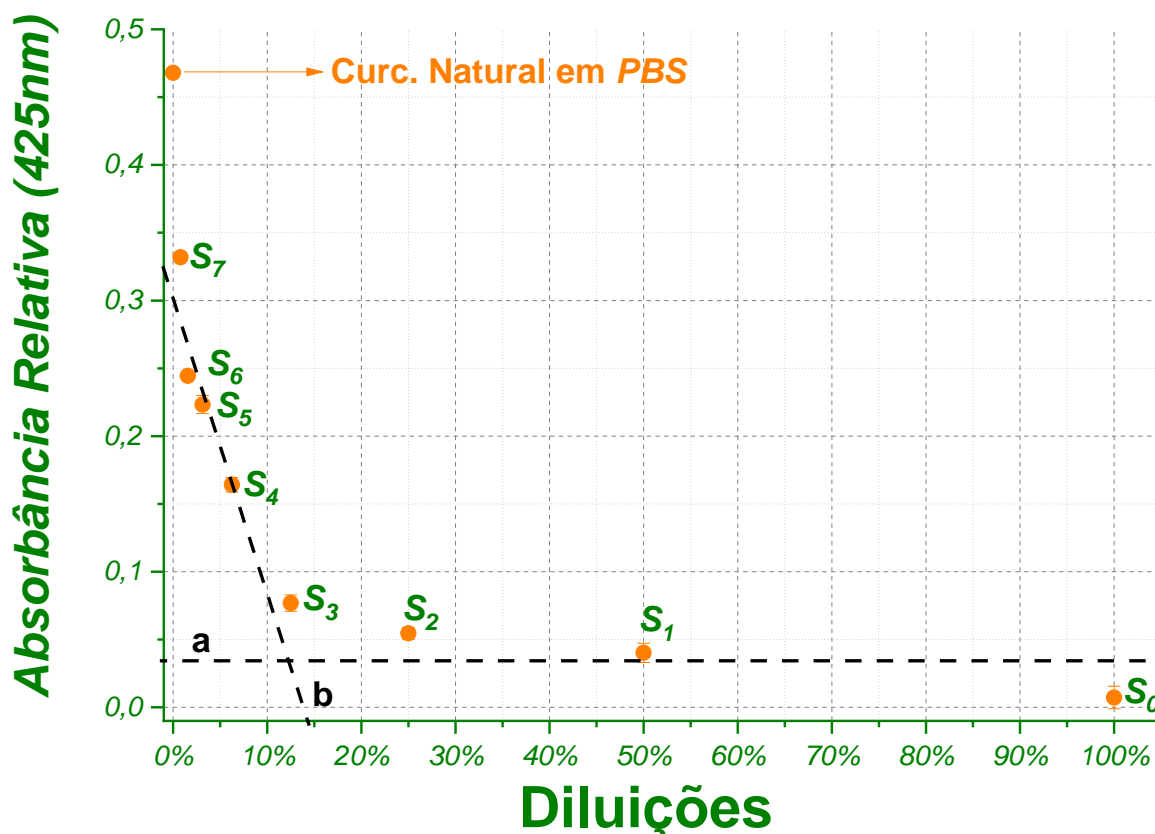


Gráfico 70 Monologarítmo resultante da análise dos picos, no comprimento de onda de 425 nm, das curvas transladadas apresentadas no Gráfico 51. Observa-se dois regimes significativos em relação ao comportamento da quantidade de curcumina Natural que interagiu com a *S. mutans*, que estão representados pelas retas tracejadas em preto. A curva (a) mostra um regime de acentuado de crescimento da absorbância relativa referente à curcumina livre no sobrenadante a partir da diluição S₃ e até a diluição S₇. A curva (b) apresenta uma pequena variação da quantidade de curcumina Natural livre no meio, apresentada pela variação da absorbância de 0,009 até 0,04, entre as diluições S₀ e S₃.

Fonte: Elaborado pelo autor

LL. Gráfico relativo da Concentração molar da curcumina Natural livre no sobrenadante dos picos em 425 nm das curvas transladadas das absorvâncias médias do caldo lavado da *S. mutans* referente às triplicatas biológicas das diluições S pelo relativo UFC médio / ml

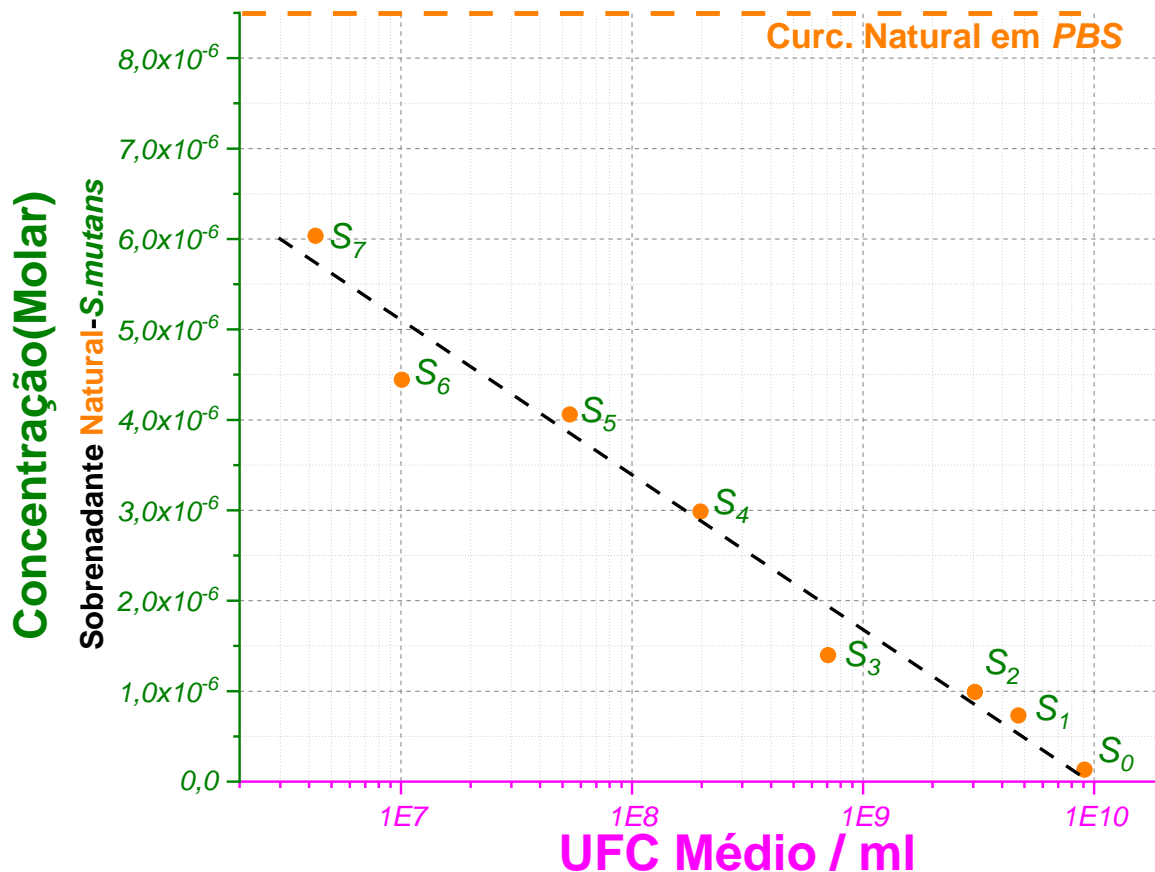


Gráfico 71 Monologarítmo construído com as informações do Gráfico 60, para o eixo das ordenadas obtido pela correlação das absorvâncias relativas no comprimento de onda de 425 nm do sobrenadante contendo curcumina Sintética livre com a concentração molar do Gráfico 1-b, e o eixo das abscissas obtido pelas informações do Gráfico 48, apêndice P. Evidenciam-se um regime linear para as diferentes concentrações molares de curcumina Sigma livre que está representada pela linha tracejada em preto. A concentração molar da curcumina livre do sobrenadante vai de, aproximadamente, 0,12 μM , S₀, para 6,0 μM , S₇, em uma variação de UFC médio / ml de $9,4 \times 10^9$ para $4,3 \times 10^6$, respectivamente, de S₀ para S₇.

Fonte: Elaborado pelo autor

MM. Gráfico das absorvâncias médias do caldo lavado da *S. mutans* referente às triplicatas biológicas das diluições S com adição da curcumina Sintética

***Streptococcus mutans* - Curcumina Sintética**

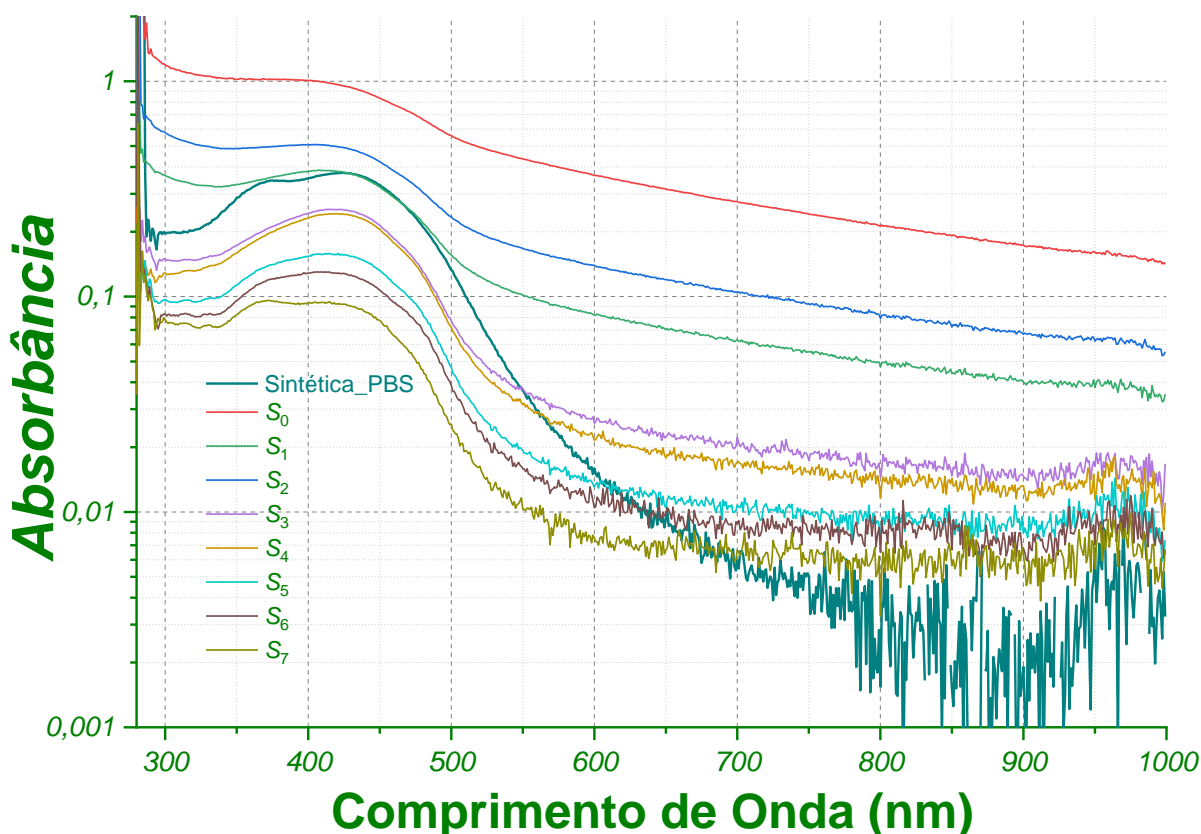


Gráfico 72 Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das médias das triplicatas biológicas das diferentes diluições S referente às diferentes concentrações do sobrenadante do caldo bacteriano lavado da *S. mutans*, com uma alíquota de $3 \mu l$, em cada uma das diluições S, retiradas das soluções stock de $10 \frac{mg}{ml}$ da curcumina Sintética preparada em solução de etanol, na concentração final de $55,1 \mu M$ por microtubo de 1,5 ml. Empreende-se que todas as curvas médias apresentam os picos característicos da presença da curcumina Sintética no comprimento de onda de 425 nm, além disso, salienta-se dois diferentes regimes de curvas de absorvância ao considerarmos os espalhamentos para os comprimentos de onda entre 600 nm e 1000 nm. Um característico da bactéria *S. mutans* para as curvas médias S_0 , S_1 e S_2 , que tem a lei de formação na equação $A(\lambda) = C_1 \cdot \lambda^{-1,7} + C_2 \cdot \lambda^{-4}$, em que S_1 , por exemplo, apresenta a equação $A(\lambda) = 2,1 \times 10^4 \cdot \lambda^{-1,8} + 5,0 \times 10^7 \cdot \lambda^{-4}$ e com espalhamentos característicos de partículas pequenas e índices de λ de $-1,9$ e -4 . Além disso, nota-se que conforme as concentrações do caldo bacteriano lavado vão diminuindo as curvas de absorvância também vão, uma vez que quanto maior for a diluição menor será a quantidade de microrganismos presentes no meio.

Fonte: Elaborado pelo autor

NN. Gráfico do translado vertical das curvas referentes às absorvâncias médias do caldo lavado da *S. mutans* referente às triplicatas biológicas das diluições S com adição da curcumina Sintética

Streptococcus mutans - Curcumina Sintética

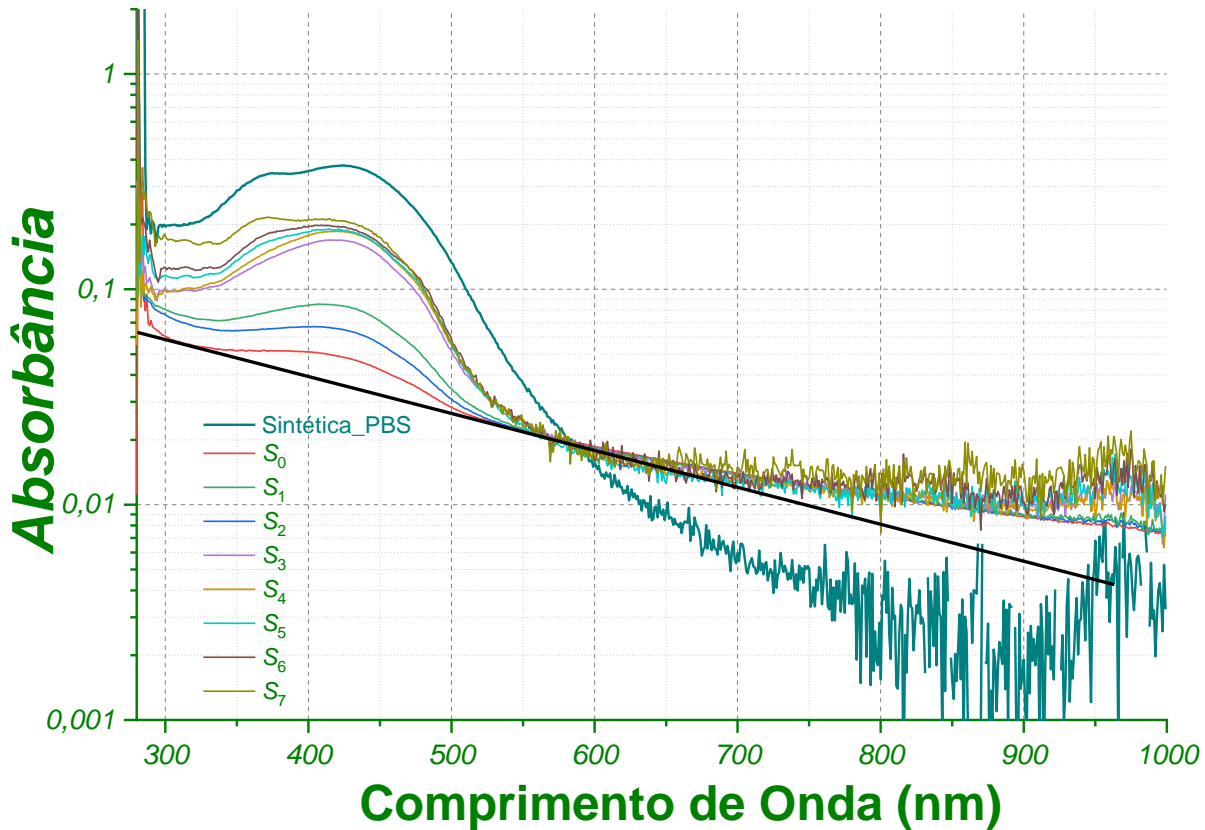


Gráfico 73 Monologarítmo dos espectros de absorvância na região espectral UV-Vis das curvas médias transladas em relação ao eixo y obtidas do anexo II. Observa-se que ao realizar o translado das curvas, no comprimento de onda de $585,81 \text{ nm}$ e absorvância de $0,0186$, todas as curvas passam por este ponto específico permitindo-se com isso desprezar o ruído de fundo gerado a partir do comprimento de onda de $585,81 \text{ nm}$ para as futuras análises, por se tratar de uma região em que o espalhamento se deve à formação de *clusters* e aglomerados particulares como tratado no subcapítulo 5.1 Caracterização óptica das curcuminas. Além disso, tem-se que ao transladar essas curvas há uma inversão do posicionamento de cada uma delas em relação à originalmente traçada. Note que a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_0 que aparecia em primeiro, de cima para baixo, no anexo II, agora aparece em último, sendo a mais próxima da curva de referência, e a curva referente às absorvâncias médias da diluição S_7 que aparecia em último, de cima para baixo, no anexo II, agora está em primeiro, ou seja, em relação à reta de referência esta é a mais distante.

Fonte: Elaborado pelo autor.

OO. Gráfico analítico percentual dos picos em 425 nm das curvas transladadas das absorbâncias médias do caldo lavado da *S. mutans* referente às triplicatas biológicas das diluições S e com adição da curcumina Sintética

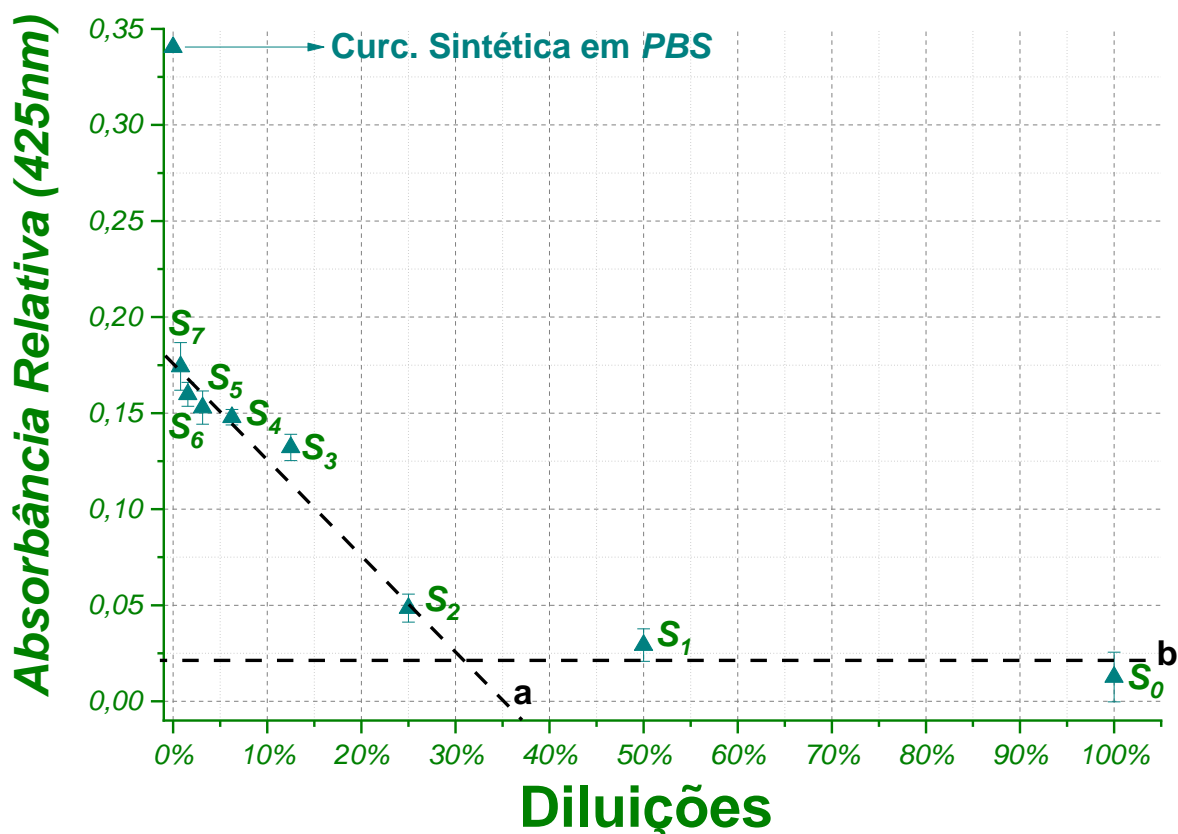


Gráfico 74 Monologarítmo resultante da análise dos picos, no comprimento de onda de 425 nm, das curvas transladadas apresentadas no Gráfico 59. Observa-se dois regimes significativos em relação ao comportamento da quantidade de curcumina Sintética que interagiu com a *S. mutans*, que estão representados pelas retas tracejadas em preto. A curva (a) mostra um regime de acentuado de crescimento da absorbância relativa referente à curcumina livre no sobrenadante a partir da diluição S₂ e até a diluição S₇. A curva (b) apresenta uma pequena variação da quantidade de curcumina Sintética livre no meio, apresentada pela variação da absorbância de 0,05 até 0,01, entre as diluições S₀ e S₂.

Fonte: Elaborado pelo autor

PP. Gráfico relativo da Concentração molar da curcumina Sintética livre no sobrenadante dos picos em 425 nm das curvas transladadas das absorvâncias médias do caldo lavado da *S. mutans* referente às triplicatas biológicas das diluições S pelo relativo UFC médio / ml

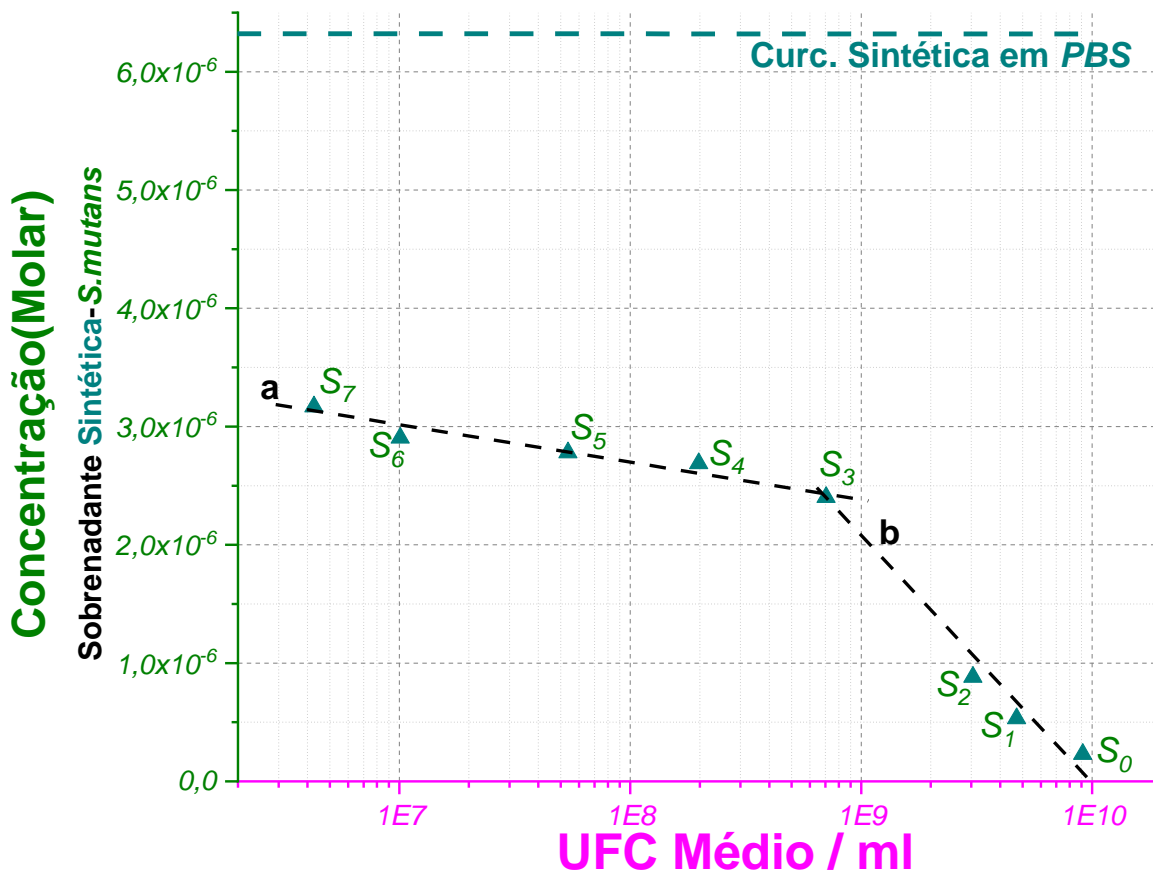


Gráfico 75 Monologarítmo construído com as informações do Gráfico 60, para o eixo das ordenadas obtido pela correlação das absorvâncias relativas no comprimento de onda de 425 nm do sobrenadante contendo curcumina Sintética livre com a concentração molar do Gráfico 1-b, e o eixo das abscissas obtido pelas informações do Gráfico 48, apêndice P. Evidenciam-se dois regimes lineares para as diferentes concentrações molares de curcumina Sintética livre que estão representadas pelas linhas tracejadas em preto. A linha (a) com a concentração molar da curcumina livre do sobrenadante vai de, aproximadamente, 2,4 μM , S₃, para 3,2 μM , S₇, em uma variação de UFC médio / ml de $7,06 \times 10^8$ para $4,3 \times 10^6$, respectivamente, de S₃ para S₇. A linha (b) com a concentração molar da curcumina livre do sobrenadante vai de, aproximadamente, 0,23 μM , S₀, para 2,4 μM , S₃, em uma variação de UFC médio / ml de $9,1 \times 10^9$ para $7,06 \times 10^8$, respectivamente, de S₀ para S₃.

Fonte: Elaborado pelo autor

ANEXOS


ATCC Escherichia coli




Product Sheet

Escherichia coli (ATCC® 25922™)

Please read this FIRST



Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section



Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Escherichia coli* (ATCC® 25922™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.639.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 2

Description

Designation: FDA strain Seattle 1946 [DSM 1103, NCIB 12210]

Deposited Name: *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers

Antigenic Properties: Serotype O6, Biotype 1

Product Description: Does not produce verotoxin. This organism is a CLSI control strain for antimicrobial susceptibility testing. It is used for media testing, as a negative control for LT toxin production, and as a quality control strain for Abbott, API, Autobac, BBL, bioMérieux Vitek, Biosynth, Difco, IDG, Micro-Media, MicroScan™, Roche Diagnostics, and Sensititre products. Used in susceptibility disc testing of neomycin, colistin [colimycin], kanamycin, cephalaxin, gentamicins, cefamandole, cephalothin, tetracycline, cephaloglycin, cephaloridine [cephalomylin], nalidixic acid, and chloramphenicol.

Propagation

Medium

ATCC® Medium 18: Trypticase Soy Agar/Broth

Growth Conditions

Temperature: 37°C

Atmosphere: Aerobic

Propagation Procedure

1. Open vial according to enclosed instructions.
2. Using a single tube of #18 broth (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a Pasteur or 1.0 mL pipette. Rehydrate the entire pellet.
3. Aseptically transfer this aliquot back into the broth tube. Mix well.
4. Use several drops of the suspension to inoculate a #18 agar slant and/or plate.
5. Incubate the tubes and plate at 37°C for 24 hours.

Notes

ATCC® 25922™ is a recommended reference strain for antibiotic susceptibility testing. It has been found that passage in broth often results in a change in MIC levels. Therefore, it is best to keep it on agar and to make stocks for storage immediately. Repeated passage is discouraged.

Purified genomic DNA of this strain is available as ATCC® 25922D-5™.

Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at www.atcc.org.

References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.

Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and



Product Sheet

***Escherichia coli* (ATCC®
25922™)**

Please read this FIRST

Storage Temp.
**Frozen: -80°C or
colder**
**Freeze-Dried: 2°C
to 8°C**
**Live Culture: See
Propagation
Section**

Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Escherichia coli* (ATCC® 25922™)

patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.
© ATCC 2017. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [08/00]

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

II. ATCC Staphylococcus aureus




ATCC


Product Sheet

Staphylococcus aureus *subsp. aureus* (ATCC® 25923™)

Please read this FIRST

Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section





Biosafety Level
2

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (ATCC® 25923™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 2

Description

Designation: Seattle 1945

Deposited Name: *Staphylococcus aureus* Rosenbach

Product Description: Quality control strain for the CAMP test, assay of wood smoke concentrate, evaluation of Mueller-Hinton agar, examination of dairy products, media testing, CLSI disk diffusion, and for Abbott, API, and Autobac products.

Propagation

Medium

ATCC® Medium 18: Trypticase Soy Agar/Broth

Growth Conditions

Temperature: 37°C

Atmosphere: Aerobic

Propagation Procedure

1. Open vial according to enclosed instructions.
2. Using a single tube of #18 broth (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a Pasteur or 1.0 mL pipette. Rehydrate the entire pellet.
3. Aseptically transfer this aliquot back into the broth tube. Mix well.
4. Use several drops of the suspension to inoculate a #18 agar slant and/or plate.
5. Incubate the tubes and plate at 37°C for 24 hours.

Notes

It is advisable to transfer from agar to agar to maintain MIC values.

Several GenBank accessions are available for this item:

1. Nucleotide (GenBank) : AF053568 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 heat shock protein 60 gene, partial cds.
2. Nucleotide (GenBank) : AX110511 Sequence 1244 from Patent WO0123604.
3. Nucleotide (GenBank) : AX110995 Sequence 1728 from Patent WO0123604.
4. Nucleotide (GenBank) : U02910 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 16S rRNA gene, partial sequence.
5. Nucleotide (GenBank) : U39769 *Staphylococcus aureus* 16S-23S ribosomal RNA spacer region.
6. Nucleotide (GenBank) : Z16422 *S. aureus* *dhfrB* gene for dihydrofolate reductase.
7. Nucleotide (GenBank) : AB047239 *Staphylococcus aureus* DNA, complete structure of cassette chromosome(SCC)-like element, strain:ATCC 25923.

Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at www.atcc.org.

References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.

Biosafety Level: 2

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.



Product Sheet

***Staphylococcus aureus*
subsp. *aureus* (ATCC®
25923™)**

Please read this FIRST

Storage Temp.
Frozen: -80°C or
colder
Freeze-Dried: 2°C
to 8°C
Live Culture: See
Propagation
Section

Biosafety Level
2

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 25923™)

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.
© ATCC 2018. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [11/00]

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

III. ATCC – Streptococcus mutans



ATCC

Product Sheet

Streptococcus mutans (ATCC® 25175™)

Please read this FIRST

Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section

Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Streptococcus mutans* (ATCC® 25175™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 2

Description

Designation: NCTC 10449 (IFO 13955)

Deposited Name: *Streptococcus mutans* Clarke

Product Description: Type strain

Propagation

Medium

ATCC® Medium 44: Brain Heart Infusion Agar/Broth

Growth Conditions

Temperature: 37°C

Atmosphere: Aerobic

Propagation Procedure

1. Open vial according to enclosed instructions or visit www.atcc.org for instructions.
2. Rehydrate the entire pellet with approximately 0.5 mL of #44 broth. Aseptically transfer the entire contents to a 5-6 mL tube of #44 broth. Additional test tubes can be inoculated by transferring 0.5 mL of the primary broth tube to these secondary tubes.
3. Use several drops of the primary broth tube to inoculate a #44 plate and/or #44 agar slant.
4. Incubate at 37°C for 24 to 48 hours.

Notes

Two colony types can be seen on ATCC Medium #44.

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.

References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.

Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org.





Product Sheet

Streptococcus mutans
(ATCC® 25175™)

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.
© ATCC 2017. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [07/27]

Please read this FIRST

	Storage Temp.
	Frozen: -80°C or colder
	Freeze-Dried: 2°C to 8°C
	Live Culture: See Propagation Section
<hr/>	
	Biosafety Level 1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Streptococcus mutans* (ATCC® 25175™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

IV. Curcumina Sigma Aldrich

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

FICHA DE INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DE PRODUTOS QUÍMICOS

Versão 5.7
Data de revisão 12.04.2017
Data de impressão 13.11.2017

1. IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO E DA EMPRESA

1.1 Identificadores do produto

Nome do produto : Curcumin

Referência do Produto : C1386

Marca : Sigma

1.2 Outros meios de identificação

Natural Yellow 3

(E,E)-1,7-bis(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione

Diferulylmethane

Diferuloylmethane

1.3 Utilizações identificadas relevantes da substância ou mistura e utilizações desaconselhadas

Só para utilização R&D. Não para utilização farmacêutica, doméstica ou outras utilizações.

1.4 Identificação do fornecedor da ficha de dados de segurança

Companhia : Sigma-Aldrich Brasil Ltda.
Av. das Nações Unidas, 23.043
04795-100 SÃO PAULO - SP
BRAZIL

Telefone : +55 11 3732 3100

Número de Fax : +55 11 5522 9895

Email endereço : sigmabr@sial.com

1.5 Número de telefone de emergência

0800-720-8000

2. IDENTIFICAÇÃO DE PERIGOS

2.1 Classificação GHS

Toxicidade aguda, Oral (Categoria 5)

2.2 Elementos da Etiqueta GHS, incluindo declarações de prevenção

Pictograma : nenhum(a)

Palavra de advertência : Atenção

Frases de Perigo

H303 : Pode ser perigoso por ingestão.

Frases de Precaução

Resposta

P312 : Caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.

2.3 Outros Perigos - nenhum(a)

3. COMPOSIÇÃO E INFORMAÇÕES SOBRE OS INGREDIENTES

3.1 Substâncias

Sigma - C1386 Curcumin

Página 1 de 7
Data de revisão 12.04.2017

Sinónimos	: Natural Yellow 3 (E,E)-1,7-bis(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione Diferulylmethane Diferuloylmethane
Formula	: C ₂₁ H ₂₀ O ₆
Peso molecular	: 368.38 g/mol
No. CAS	: 458-37-7

Componente	Concentração
No. CAS	458-37-7
No. CE	207-280-5
	<= 100 %

4. MEDIDAS DE PRIMEIROS-SOCORROS

4.1 Descrição das medidas de primeiros socorros

Recomendação geral

Consultar um médico. Mostrar esta ficha de segurança ao médico de serviço.

Em caso de inalação

Se for respirado, levar a pessoa para o ar fresco. Se não respirar, dar respiração artificial. Consultar um médico.

Em caso de contacto com a pele

Lavar com sabão e muita água. Consultar um médico.

Se entrar em contacto com os olhos

Lavar os olhos com água como precaução.

Em caso de ingestão

Nunca dar nada pela boca a uma pessoa inconsciente. Enxaguar a boca com água. Consultar um médico.

4.2 Sintomas e efeitos mais importantes, tanto agudos como retardados

Até onde sabemos, as propriedades químicas, físicas e toxicológicas não foram minuciosamente investigadas.

4.3 Indicações sobre cuidados médicos urgentes e tratamentos especiais necessários

Dados não disponíveis

5. MEDIDAS DE COMBATE A INCENDIO

5.1 Meios de extinção

Meios adequados de extinção

Utilizar água pulverizada, espuma resistente ao álcool, produto químico seco ou dióxido de carbono.

5.2 Perigos especiais decorrentes da substância ou mistura

Dados não disponíveis

5.3 Recomendações para o pessoal de combate a incêndios

Usar equipamento de respiração autónomo para combate a incêndios, se necessário.

5.4 Informações adicionais

Dados não disponíveis

6. MEDIDAS DE CONTROLE PARA DERRAMAMENTO OU VAZAMENTO

6.1 Precauções individuais, equipamento de proteção e procedimentos de emergência

Usar equipamento de proteção individual. Evitar a formação de poeira. Evitar a respiração do vapor/névoa/gas. Evitar de respirar o pó.

- 6.2 Precauções a nível ambiental**
Não permitir a entrada do produto no sistema de esgotos.
- 6.3 Métodos e materiais de confinamento e limpeza**
Apanhar os resíduos sem levantar poeiras. Varrer e apanhar com uma pá. Manter em recipientes fechados adequados, para eliminação.
- 6.4 Remissão para outras secções**
Para eliminação de resíduos ver secção 13.

7. MANUSEIO E ARMAZENAMENTO

- 7.1 Precauções para um manuseamento seguro**
Evitar a formação de pó e aerossóis.
Providenciar uma adequada ventilação em locais onde se formem poeiras.
- 7.2 Condições de armazenagem segura, incluindo eventuais incompatibilidades**
Guardar o recipiente hermeticamente fechado em lugar seco e bem ventilado.
Temperatura recomendada de armazenagem -20 °C
- 7.3 Utilização(ões) final(is) específica(s)**
Dados não disponíveis

8. CONTROLE DE EXPOSIÇÃO E PROTEÇÃO INDIVIDUAL

- 8.1 Parâmetros de controlo**
Límites de exposição ocupacional
Não contem substâncias com valores limites de exposição profissional.
- 8.2 Controlo da exposição**
Controlos técnicos adequados
Manusear de acordo com as boas práticas industriais de higiene e segurança. Lavar as mãos antes dos intervalos e no final do dia de trabalho.
- Proteção individual**
- Proteção ocular/ facial**
Use equipamento de proteção ocular testado e aprovado de acordo com as normas governamentais adequadas, tais como NIOSH (US) ou EN 166 (EU).
- Proteção da pele**
Manusear com luvas. As luvas devem ser inspeccionadas antes da utilização. Use uma técnica adequada para a remoção das luvas (sem tocar a superfície exterior da luva) para evitar o contacto da pele com o produto. Descarte as luvas contaminadas após o uso, em conformidade com as leis e boas práticas de laboratório. Lavar e secar as mãos.

As luvas de proteção seleccionadas devem satisfazer as especificações da Directiva da UE 89/689/CEE e a norma EN 374 derivada dela.
- Contacto total**
Material: Borracha de nitrilo
espessura mínima da capa: 0.11 mm
Pausa através do tempo: 480 min
Material ensaiado: Dermatril® (KCL 740 / Aldrich Z877272, Tamanho M)
- Contacto com salpicos**
Material: Borracha de nitrilo
espessura mínima da capa: 0.11 mm
Pausa através do tempo: 480 min
Material ensaiado: Dermatril® (KCL 740 / Aldrich Z877272, Tamanho M)
- fonte de dados: KCL GmbH, D-38124 Eichenzell, Telefone +49 (0)6659 87300, e-mail sales@kcl.de,
Método de ensaio: EN374

Se for utilizado em solução, ou misturado com outras substâncias, e sob condições que diferem da EN 374, contactar o fornecedor de luvas da CE. Esta recomendação é apenas desejável e deve ser avaliada por um responsável de segurança e higiene industrial familiarizado com a situação específica de utilização pretendida pelos nossos clientes. Não deve ser interpretado como uma oferta de aprovação para qualquer cenário de uso específico

Protecção do corpo

Escolher uma protecção para o corpo em relação com o tipo, a concentração e a quantidade da substância perigosa, e com o lugar de trabalho específico. O tipo de equipamento de protecção deve ser escolhido de acordo com a concentração e a quantidade da substância perigosa no local de trabalho.

Protecção respiratória

Não é necessária protecção respiratória. Se desejar protecção contra níveis de pó incomodativos, use máscaras de pó do tipo N95 (E.U.A.) ou do tipo P1 (EN 143). Use respiradores e componentes testados e aprovados por normas governamentais apropriadas, tais como as NIOSH (E.U.A.) ou CEN (UE).

9. PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS

9.1 Informações sobre propriedades físicas e químicas de base

a) Aspeto	Forma: pó
b) Odor	Dados não disponíveis
c) Limite de Odor	Dados não disponíveis
d) pH	Dados não disponíveis
e) Ponto de fusão/ponto de congelamento	Ponto/intervalo de fusão: 175 °C
f) Ponto de ebulição inicial e intervalo de ebulição	Dados não disponíveis
g) Ponto de fulgor	Dados não disponíveis
h) Taxa de evaporação	Dados não disponíveis
i) Inflamabilidade (sólido, gás)	Dados não disponíveis
j) Limites de inflamabilidade superior / inferior ou explosividade	Dados não disponíveis
k) Pressão de vapor	Dados não disponíveis
l) Densidade de vapor	12.72 - (Ar = 1.0)
m) Densidade relativa	Dados não disponíveis
n) Hidrossolubilidade	Dados não disponíveis
o) Coeficiente de partição n-octanol/água	Dados não disponíveis
p) Temperatura de auto-ignição	Dados não disponíveis
q) Temperatura de decomposição	Dados não disponíveis
r) Viscosidade	Dados não disponíveis

10. ESTABILIDADE E REATIVIDADE

- 10.1 Reatividade**
Dados não disponíveis
- 10.2 Estabilidade química**
Dados não disponíveis
- 10.3 Possibilidade de reações perigosas**
Dados não disponíveis
- 10.4 Condições a evitar**
Dados não disponíveis
- 10.5 Materiais incompatíveis**
Dados não disponíveis
- 10.6 Produtos de decomposição perigosos**
Produtos perigosos de decomposição formados durante os incêndios. - Óxidos de carbono
Outros produtos de decomposição perigosos - Dados não disponíveis

11. INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS
11.1 Informações sobre os efeitos toxicológicos**Toxicidade aguda**

DL50 Oral - Rato - > 2,000 mg/kg

DL50 Oral - Ratazana - > 2,000 mg/kg

Inalação: Dados não disponíveis

Corrosão/irritação cutânea

Dados não disponíveis

Lesões oculares graves/irritação ocular

Dados não disponíveis

Sensibilização respiratória ou cutânea

Dados não disponíveis

Mutagenicidade em células germinativas

Dados não disponíveis

Carcinogenicidade

IARC: Nenhum componente deste produto presente a níveis maiores ou iguais a 0.1% é identificado como carcinogénio provável, possível ou confirmado pelo IARC.

Toxicidade à reprodução e lactação

Dados não disponíveis

Toxicidade sistêmica para órgãos-alvo específicos - exposição única

Dados não disponíveis

Toxicidade sistêmica para órgãos-alvo específicos - exposição repetida

Dados não disponíveis

Perigo de aspiração

Dados não disponíveis

Possíveis danos para a saúde

Inalação	Pode ser perigoso se for inalação. Pode causar uma irritação do aparelho respiratório.
Ingestão	Pode ser perigoso se for engolido.
Pele	Pode ser perigoso se for absorvido pela pele. Pode causar uma irritação da pele.

Olhos Pode causar uma irritação dos olhos.

Sinais e sintomas de exposição

Até onde sabemos, as propriedades químicas, físicas e toxicológicas não foram minuciosamente investigadas.

Informação adicional

RTECS: MI5230000

Informações adicionais

Dados não disponíveis

12. INFORMAÇÕES ECOLÓGICAS

12.1 Ecotoxicidade

Dados não disponíveis

12.2 Persistência e degradabilidade

Dados não disponíveis

12.3 Potencial biocumulativo

Dados não disponíveis

12.4 Mobilidade no solo

Dados não disponíveis

12.5 Resultados da avaliação PBT e mPmB

Dados não disponíveis

12.6 Outros efeitos adversos

Dados não disponíveis

13. CONSIDERAÇÕES SOBRE TRATAMENTO E DISPOSIÇÃO

13.1 Métodos de tratamento de resíduos

Produto

Dissolver ou misturar o material com um solvente combustível e queimar em incinerador químico equipado com pós-combustor e purificador de gases. Deve ser eliminado como resíduo perigoso de acordo com a legislação local. O tratamento e a disposição devem ser avaliados especificamente para cada produto. Devem ser consultadas legislações federais, estaduais e municipais. Manter restos de produto em suas embalagens originais e devidamente fechadas. O descarte deve ser realizado conforme o estabelecido para o produto.

Embalagens contaminadas

Não reutilize embalagens vazias. Estas podem conter restos do produto e devem ser mantidas fechadas e encaminhadas para descarte apropriado conforme estabelecido para o produto.

14. INFORMAÇÕES SOBRE TRANSPORTE

14.1 Número ONU

ADR/RID: - DOT (US): - IMDG: - IATA: - ANTT: -

14.2 Designação oficial de transporte da ONU

ADR/RID: Mercadorias não perigosas
 DOT (US): Mercadorias não perigosas
 IMDG: Mercadorias não perigosas
 IATA: Mercadorias não perigosas
 ANTT: Mercadorias não perigosas

14.3 Classes de perigo para efeitos de transporte

ADR/RID: - DOT (US): - IMDG: - IATA: - ANTT: -

14.4 Grupo de embalagem

ADR/RID: - DOT (US): - IMDG: - IATA: - ANTT: -

14.5 Perigos para o ambiente

ADR/RID: não DOT (US): não IMDG Poluente marinho: não IATA: não

14.6 Precauções especiais para o utilizador

Dados não disponíveis

14.7 Numero De Risco**15. REGULAMENTAÇÕES****15.1 Regulamentação/legislação específica para a substância ou mistura em matéria de saúde, segurança e ambiente**

Esta Ficha de Informações de Produtos Químicos foi preparada de acordo com a NBR 14725-4/2014 da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas)

16. OUTRAS INFORMAÇÕES**Informações adicionais**

Direitos exclusivos, 2016, da Sigma-Aldrich Co. LLC. Permissão concedida para fazer número ilimitado de cópias em papel, somente para uso interno.

Acredita-se que as informações acima estejam correctas, embora não pretendam ser totalmente abrangentes, devendo ser usadas apenas como um guia. A informação contida neste documento esta baseada no presente estado do nosso conhecimento e é aplicável às precauções de segurança apropriadas para o produto. Não representa nenhuma garantia das propriedades do produto. A Corporação Sigma-Aldrich e as suas companhias afiliadas, não responderão por nenhum dano resultante do manuseio ou do contato com o produto acima. Consultar www.sigma-aldrich.com e/ou o verso da factura ou nota que acompanha o produto para tomar conhecimento dos termos adicionais e condições de venda.
