

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

YORDANIA MATOS GÁMEZ

*Avaliação de técnicas ópticas para descontaminação de órgãos sólidos para  
transplante em modelos in vitro e ex vivo*

São Carlos  
2022



YORDANIA MATOS GÁMEZ

*Avaliação de técnicas ópticas para descontaminação de órgãos sólidos para transplante em modelos in vitro e ex vivo*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada  
Opção: Física Biomolecular  
Orientador: Profa Dra. Cristina Kurachi

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

São Carlos  
2022

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.

Matos Gámez, Yordania

Avaliação de técnicas ópticas para descontaminação de órgãos sólidos para transplante em modelos in vitro e ex vivo / Yordania Matos Gámez; orientador Cristina Kurachi - versão corrigida -- São Carlos, 2022.

122 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2022.

1. Radiação UV-C. 2. Terapia fotodinâmica. 3. Inativação microbiana. 4. Perfusão ex vivo. 5. Descontaminação de fígado. I. Kurachi, Cristina, orient. II. Título.

Dedico este trabajo a mis padres Mirna y Riquildo y a mi hermana Yoandra, pues gracias a ellos soy la persona en la que me he convertido hoy, inculcándome valores y principios que me hacen cada día mejor. A ellos, que siempre confiaron en mí y me brindaron su apoyo incondicional en todo momento.

A mi hija Tábatha, el gran amor de mi vida, que me da las fuerzas que necesito para continuar adelante sin importar cuántas barreras tenga que atravesar para alcanzar mis objetivos.



## AGRADECIMENTOS

Agradezco a **Dios todo poderoso**, en su infinita bondad, por mi vida, por guiarme e iluminar mi camino, por darme fuerzas para seguir adelante cuando creía que todo estaba perdido.

A toda mi familia, en especial a mis padres Mirna y Riquildo y hermana Yoandra, por su apoyo incondicional, dedicación y amor. A mi princesita Tábatha por brindarme tanto amor y ser el motor impulsor que me da fuerzas para seguir adelante y superar todos los obstáculos.

A mi esposo Luis Carlos por su apoyo incondicional, amor y comprensión. Por ser mi compañero y amigo, por ayudarme a levantar cuando estaba perdiendo las fuerzas para continuar adelante con mis proyectos.

A mis amigos Loraine, Erika, Camilinha, Johan y mi madrina Eunice, los cuales forman parte de mi familia; que siempre han estado conmigo en los buenos y malos momentos, dándome su apoyo incondicional.

A Jose Dirceu, por sus consejos y ayuda durante todo el doctorado, mostrándome que siempre es posible, que después de la tormenta, llega la calma.

A la profesora Cristina Kurachi por ser mi orientadora y por darme la oportunidad de formar parte del grupo de pesquisa; por el soporte científico, análisis y sugerencias que fueron de extrema importancia para el desenvolvimiento de la pesquisa y por ser, además de orientadora, amiga.

Al profesor Vanderlei y Natalia por su ayuda, contribución científica e incentivo a mi crecimiento profesional.

A los integrantes del grupo de descontaminación de órganos: José Dirceu, Caroline, Loraine y de forma general a todos los colegas del grupo de Biofotónica que de una forma u otra contribuyeron al desenvolvimiento de la pesquisa.

Al Dr. Flavio Henrique Ferreira Galvão por su colaboración en la realización de los experimentos con ratones Wistar.

A Daniel por el desenvolvimiento de la cámara de filtro de sentido único, indispensable para el desarrollo de esta pesquisa.

Al Laboratorio de Apoyo técnico del Instituto de física de São Carlos (LAT), en especial a Vinicius por el desenvolvimiento de los equipos de descontaminación utilizados em la pesquisa.

Al Instituto de Física de São Carlos: profesores, funcionarios, técnicos de laboratorio por su gran contribución en mi carrera profesional.

A las agencias de fomento de Brasil, FAFQ, CAPES, CNPq, FAPESP, en especial CAPES que me apoyó con el financiamiento de mi trabajo de doctorado.

**“O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) Código de financiamento 88882.328732/2019-01”.**

*“Tudo aquilo que o homem ignora, não existe para ele. Por isso o universo de cada um, se resume ao tamanho de seu saber.”*

*Albert Einstein*



## RESUMO

MATOS GÁMEZ, Y. **Avaliação de técnicas ópticas para descontaminação de órgãos sólidos para transplantes em modelos *in vitro* e *ex vivo***. 2022. 122p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

A disponibilidade de órgãos é um fator limitante para o transplante, resultando em altas taxas de mortalidade de pacientes na lista de espera. A infecção de órgãos por microrganismos patogênicos é uma das causas de descarte de órgãos, devido ao alto risco de contaminação do receptor e os consequentes problemas associados. A radiação ultravioleta C e a Terapia Fotodinâmica são modalidades antimicrobianas estabelecidas para a inativação de microrganismos patogênicos, e quando combinada com a perfusão *ex vivo* do órgão pode se tornar uma alternativa para o tratamento de enxertos contaminados. Neste estudo, investigamos a viabilidade do uso da radiação UV-C e a Terapia Fotodinâmica para a descontaminação de órgão sólido em modelos *in vitro* e *ex vivo* associados à perfusão em um equipamento de perfusão renal. Diferentes modelos *in vitro* foram desenvolvidos simulando condições estruturais distintas de adesão bacteriana no interior do modelo e avaliando a contaminação bacteriana remanescente dos materiais, sendo utilizadas membranas metálicas e uma cerâmica porosa como superfícies para a contaminação bacteriana. A linhagem bacteriana *Staphylococcus aureus* foi utilizada nas formas planctônica e em biofilme. Nos modelos *in vitro* a radiação UV-C de 60 min e fluência 64,8 J/cm<sup>2</sup> promoveu a inativação completa no perfusato circulante de 6 a 7 log (CFU/mL). No entanto, não houve a descontaminação dos materiais. A combinação da radiação UV-C com 500 mg de Oxacilina Sódica no perfusato não foi efetiva para alterar a aderência nem a viabilidade das células bacterianas nos materiais contaminados. A Terapia Fotodinâmica para a descontaminação do Custodiol<sup>®</sup> circulante com azul de metileno e 660 nm obteve inativação de apenas 1 log (CFU/mL) durante 4 h de irradiação (fluência de 432 J/cm<sup>2</sup>). Novamente não foi observada descontaminação relevante dos materiais empregados. Finalmente, foi utilizado um modelo *ex vivo* de fígado de rato infectado, e os resultados também mostraram contaminação residual de órgãos e até mesmo uma diminuição da eficácia de inativação no perfusato. Os resultados mostram a viabilidade da utilização da radiação UV-C na inativação de *S. aureus* do meio circulante e a relevância do desenvolvimento de métodos alternativos para a desaderência bacteriana ou tratamento antimicrobiano *in situ* para melhorar a descontaminação de órgãos em combinação com o tratamento UVC do perfusato.

Palavras-chave: Radiação UV-C. Terapia fotodinâmica. Inativação microbiana. Perfusão *ex vivo*. Descontaminação de fígado.

## ABSTRACT

MATOS GÁMEZ, Y. Evaluation of optical techniques for decontamination of organs for transplantation *in vitro* and *ex vivo* models. 2022. 122p. Thesis (Doctor in Science) - São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos, 2022.

The availability of organs is a limiting factor for transplantation, resulting in high mortality rates of patients on the waiting list. Organ infection by pathogenic microorganisms is one of the causes of organ discarding, due to the high risk of contamination of the recipient and the consequent associated problems. Ultraviolet C radiation and Photodynamic Therapy are established antimicrobial modalities for the inactivation of pathogenic microorganisms, and when combined with *ex vivo* organ perfusion may become an alternative for the treatment of contaminated grafts. In this study, we investigated the feasibility of using UV-C radiation and Photodynamic Therapy for solid organ decontamination in *in vitro* and *ex vivo* models associated with perfusion in a renal perfusion machine. Different *in vitro* models were developed simulating different structural conditions of bacterial adhesion inside the model and evaluating the remaining bacterial contamination of the materials, using metallic membranes and a porous ceramic as surfaces for bacterial contamination. The bacterial strain *Staphylococcus aureus* was used in planktonic and biofilm forms. In the *in vitro* models, UV-C radiation of 60 min and fluence 64,8 J/cm<sup>2</sup> promoted the complete inactivation in the circulating perfusate of 6 to 7 log (CFU/mL). However, there was no decontamination of the materials. The combination of UV-C radiation with 500 mg Oxacillin Sodium in the perfusate was not effective in altering the adherence and viability of the bacterial cells in the contaminated materials. Photodynamic therapy for decontamination of circulating Custodiol® with methylene blue and 660 nm obtained inactivation of only 1 log (CFU/mL) during 4 h of irradiation (fluence of 432 J/cm<sup>2</sup>). Again, no relevant decontamination of the materials used was observed. Finally, an *ex vivo* infected rat liver model was used, and the results also showed residual organ contamination and even a decrease in inactivation efficiency in the perfusate. The results show the feasibility of using UV-C radiation in the inactivation of *S. aureus* of the circulating medium and the relevance of developing alternative methods for bacterial deadherence or *in situ* antimicrobial treatment to improve organ decontamination in combination with UVC treatment of the perfusate.

Keywords: UV-C radiation. Photodynamic therapy. Microbial inactivation. Ex-vivo perfusion. Liver decontamination.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Vista posterior do fígado: \*ligamento da veia cava; \*\*Limites do recesso superior da bolsa omental..... 32
- Figura 2 - Imagem ilustrativa do espectro eletromagnético da luz ultravioleta e mecanismo de ação da radiação ultravioleta C UV-C: dimerização da timina e efeito mutagênico da radiação ultravioleta no material genético. .... 35
- Figura 3 - Imagem do desenho esquemático do grau de dano causado pela irradiação UV aos agentes patogênicos (bactérias, parasitas, vírus) e às proteínas nos diferentes comprimentos de onda..... 36
- Figura 4 - Imagem do espectro da lâmpada UV-C utilizada nos experimentos desenvolvidos. .... 37
- Figura 5 - Representação esquemática do mecanismo de ação da TFDa por meio do diagrama de Jablonski. .... 39
- Figura 6 - Imagem ilustrativa dos componentes do sistema utilizado para a inativação bacteriana simulando a perfusão *ex vivo* do órgão: a: Fonte de irradiação de luz UV-C; b: Bomba peristáltica; c: Câmara de filtração. .... 45
- Figura 7 - Imagem ilustrativa da câmara de filtração unidirecional (painel A) e materiais utilizados para fornecer barreiras físicas e retenção bacteriana (painel B). Painel A: partes da câmara de filtração: os elementos *a, b, c, d* são segmentos de aço inoxidável; *e, f* são conectores rápidos para conectar os tubos de silicone; *g, h, i* apontam anéis onde são colocadas membranas e anéis de borracha vulcanizada que unem os segmentos e são ajustados por abraçadeiras. Painel B: câmara de filtração contendo membrana e esponja vegetal com peça cerâmica: *a* indica a membrana; *b* indica a bucha vegetal contendo a peça cerâmica; e *c* indica a peça cerâmica..... 47
- Figura 8 - Esquema descritivo do processo de inativação bacteriana com radiação ultravioleta-C simulando a perfusão no modelo experimental utilizado: a: Fonte de irradiação de luz UV-C; b: Bomba peristáltica WP10; c: Câmara de filtração; d: tubo de quartzo aonde é irradiado o líquido circulante contaminado; e: membrana com poros de 5µm; e: esponja vegetal com os fragmentos de cerâmica. O sistema contém tubos de silicone que conectam cada um dos componentes permitindo a circulação do líquido bombeado pela bomba peristáltica mantendo um fluxo contínuo de 200 mL/min. .... 51

- Figura 9 - Efeito da irradiação ultravioleta UV-C (254 nm) na inativação bacteriana em PBS por 240 min usando a câmara de filtragem contendo membranas contaminadas com *S. aureus* planctônicas. Os eixos indicam crescimento bacteriano em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e a fluência (UV-C) em  $J/cm^2$ . As amostras do grupo controle são mostradas com quadrados pretos e as amostras do grupo irradiado com círculos vermelhos..... 54
- Figura 10 - Contaminação remanescente de *S. aureus* em membranas após banho ultrassônico e coleta de *swab* nos testes controle e irradiado no modelo aonde as membranas foram contaminadas com bactérias planctônicas. As barras laranja, verde e roxa representam as membranas um (M1), dois (M2) e três (M3), respectivamente..... 55
- Figura 11 - Efeito da radiação ultravioleta UV-C (254 nm) na inativação bacteriana em PBS usando uma câmara de filtro contendo membranas contaminadas com colônias de *S. aureus*. Os eixos indicam o crescimento bacteriano em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e a fluência em  $J/cm^2$ . As amostras do grupo controle são mostradas com quadrados pretos e as amostras do grupo irradiadas com círculos vermelhos..... 56
- Figura 12 - Carga bacteriana remanescente de *S. aureus* em membranas após banho ultrassônico e coleta de *swab* nos testes controle e irradiado no modelo aonde as membranas foram contaminadas com esfregaços de colônias da bactéria. As barras laranja, verde e roxa representam as membranas um (M1), dois (M2) e três (M3), respectivamente. .... 57
- Figura 13 - Efeito da radiação ultravioleta UV-C (254 nm) na inativação bacteriana por 240 min utilizando a câmara de filtro contendo esponja vegetal com peças cerâmicas contaminadas com *S. aureus*. Os eixos indicam o crescimento bacteriano  $\log_{10}$  em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e a fluência em  $J/cm^2$ . As amostras de controle são mostradas com quadrados pretos e as amostras irradiadas com círculos vermelhos. 61
- Figura 14 - Contaminação residual por *S. aureus* na esponja vegetal e sonicação de peças cerâmicas e coleta de *swab* nos testes controle e irradiado. As barras laranja e verde representam a esponja vegetal e as peças de cerâmica, respectivamente. .... 62
- Figura 15 - Esquema descritivo da placa para cultivo de células de 96 poços utilizada na diluição da Oxacilina Sódica 500mg para determinar sua concentração mínima inibitória. .... 68

- Figura 16 - Efeito da irradiação ultravioleta UV-C (254 nm) na estabilidade do poder bactericida da Oxacilina Sódica 500mg em PBS após de 240 min de irradiação com UV-C. Os eixos indicam crescimento bacteriano  $\log_{10}$  em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e a fluência em  $J/cm^2$  durante 240 min ..... 70
- Figura 17 - Efeito da combinação da irradiação ultravioleta UV-C (254 nm) e a Oxacilina Sódica 500 mg na inativação bacteriana em PBS por 240 min usando a câmara de filtragem contendo membranas contaminadas com *S. aureus* planctônicas. Os eixos indicam crescimento bacteriano  $\log_{10}$  em unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL) e a fluência em  $J/cm^2$ . As amostras do grupo controle são mostradas com quadrados pretos e as amostras do grupo irradiado com círculos vermelhos..... 71
- Figura 18 - Reminiscência de *S. aureus* em membranas após do banho ultrassônico e coleta de swab nos testes controle e irradiado. As barras laranja, verde e roxa representam as membranas um (M1), dois (M2) e três (M3) respectivamente. .... 72
- Figura 19 - Efeito da Oxacilina Sódica 500 mg na inativação de *S. aureus* após de 8 horas circulando em PBS. Os eixos indicam crescimento bacteriano  $\log_{10}$  em unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL) e tempo em minutos. As amostras do grupo controle (circulando PBS) são mostradas com quadrados pretos e as amostras com círculos vermelhos representam a amostra circulando PBS e Oxacilina. .... 72
- Figura 20 - Efeito da Oxacilina Sódica 500 mg na inativação de *S. aureus* após de 24 horas circulando em PBS. Os eixos indicam crescimento bacteriano  $\log_{10}$  em unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL) e tempo em minutos. As amostras do grupo controle (circulando PBS) são mostradas com quadrados pretos e as amostras com círculos vermelhos representam a amostra circulando PBS e Oxacilina. .... 73
- Figura 21 - Imagem ilustrativa da fonte de irradiação (660nm) utilizada para a inativação fotodinâmica de *S. aureus* em meio circulante. .... 76
- Figura 22 - Imagem ilustrativa do módulo de irradiação utilizado nos experimentos de fotodegradação desenvolvidos variando a temperatura: a: teste de fotodegradação feito a temperatura ambiente; b: teste de fotodegradação feito a baixas temperaturas (4-8°C)..... 78

Figura 23 - Espectro de absorção na região UV visível da solução Custodiol® mantida em circulação e irradiada durante 1h com luz vermelha (660 nm).....	80
Figura 24 - Espectro de absorção UV-visível da solução Custodiol® com Azul de Metileno 0,01% mantida em circulação e irradiada durante 1h com luz vermelha (660 nm).....	81
Figura 25 - Fotodegradação do AM no Custodiol® quando irradiado durante 60 min com luz vermelha (660 nm).....	82
Figura 26 - Citotoxicidade da solução de preservação Custodiol® ou HTK com AM 0,01% exposta à irradiação com luz vermelha (660 nm) em fibroblastos durante um tempo total de 60 min de circulação do líquido através do sistema. ....	83
Figura 27 - Efeito da TFD na inativação de <i>S. aureus</i> em Custodiol® irradiando com luz vermelha (660 nm) durante 240 min usando como fotossensibilizador o AM. Os pontos pretos e vermelhos mostram as curvas das amostras controle e irradiada respectivamente. ....	84
Figura 28 - Efeito da TFD na inativação de <i>S. aureus</i> em Custodiol® com AM irradiando com luz vermelha (660 nm) durante 240 min, mantendo o líquido circulando e adicionando 2 mL de AM cada 30 min. Os pontos pretos e vermelhos mostram as curvas das amostras controle e irradiada respectivamente. ....	86
Figura 29 - Imagem ilustrativa do sistema de perfusão de fígado combinado com o módulo de irradiação UV-C: <i>a</i> indica a bomba de infusão programável de duas seringas; <i>b</i> indica a fonte de irradiação de luz UV-C; e <i>c</i> a bomba peristáltica.....	90
Figura 30 - Esquema descritivo do processo de descontaminação de fígados de ratos Wistar simulando a perfusão <i>ex vivo</i> do órgão usando a radiação ultravioleta C na inativação de <i>S. aureus</i> no líquido circulante. Painel A: descrição sintetizada do modelo de infecção e cirurgia do rato Wistar feita para a extração do órgão. Painel B: processo de inativação bacteriana do perfusato circulante coletado ao sair do órgão utilizando o módulo de irradiação UV-C constituído pela fonte de irradiação de luz UV-C e a bomba peristáltica. ....	94

- Figura 31 - Resultados do modelo de infecção sistêmica em ratos Wistar mantendo a neutropenia por 5 e 4 dias. As barras laranja mostram o controle (inoculo injetado para indução da infecção) e as barras verdes indicam a recuperação das bactérias encontradas nos fígados após de 4 horas de ter induzido a infecção; MMF1-3 media de  $\log_{10}$  UFC/mL recuperado na maceração dos fígados dos ratos 1 a 3. .... 96
- Figura 32 - Efeito da radiação ultravioleta C na inativação de *S. aureus* do perfusato que sai dos fígados contaminados de ratos Wistar quando perfundidos com o Custodiol. .... 98
- Figura 33 - Sobrevivência de *S. aureus* em fígados de ratos após do processo de inativação com UV-C: MF1, MF2, MF3, MF4, MF5, MF6 e MF7 representam ordens de  $\log_{10}$  UFC/mL recuperadas na maceração dos fígados dos ratos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente, e MMF1-7 a media de ordens de  $\log_{10}$  UFC/mL recuperadas na maceração dos fígados dos ratos 1 a 7. .... 99
- Figura 34 - Espectro da transmitância da luz na solução de Custodiol e sangue entre 200 e 420 nm em função da concentração de sangue. .... 100
- Figura 35 - Percentual de dose entregue, por segundo, na porção central do tubo de quartzo em termos da concentração de sangue no Custodiol. Os valores à direita da linha tracejada vertical estão representados em escala logarítmica da concentração percentual, mostrando quão expressiva é a atenuação da luz UV-C na presença de pequenas porções de sangue no Custodiol. A porção à esquerda da linha tracejada vertical indica o valor de dose entregue pela lâmpada sem obstáculo (0% atenuação), com o tubo preenchido por água (15% atenuação), e no Custodiol sem sangue (aproximadamente 91% atenuação). Estes valores estão fora de escala devido à escala exponencial usada para a concentração. .... 101



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Valor da fluência fornecida calculada para cada tempo de irradiação no qual as amostras foram coletadas..... 53
- Tabela 2 - Remanescência de bactérias nas membranas após do processo de inativação de *S. aureus* fazendo circular a Oxacilina Sódica 500 mg em PBS durante 8 e 24 horas..... 73
- Tabela 3 - Valor da fluência calculada para cada tempo de irradiação no qual foram coletadas as amostras. .... 79
- Tabela 4 - Carga bacteriana residual nas membranas após do processo de inativação de *S. aureus* aplicando a TFD no Custodio com AM 0,01% circulante 4 horas. .... 85
- Tabela 5 - Remanescência de bactérias nas membranas após do processo de inativação de *S. aureus* aplicando a TFD no Custodio com AM 0,01% circulante durante 4 horas, adicionando 2 mL de AM 0,01% cada 30 min. .... 87
- Tabela 6 - Quantidade de sangue e Custodiol utilizados para preparar a solução de Custodiol e sangue de carneiro a diferentes concentrações..... 95
- Tabela 7 - Dose de entregue em função da concentração de sangue na solução de Custodiol. Os valores nas linhas amarelas representam os elementos fora de escala na Figura 35. .... 101



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTO	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (caldo infusão cérebro coração)
EHNA	Esteatohepatite não-alcoólica
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EVLP	<i>Ex vivo lung perfusion</i> (perfusão pulmonar <i>ex vivo</i> )
FS	Fotossensibilizador
GODT	Observatório Global sobre Doação e Transplante
HCV	Vírus da hepatite C
HMP	<i>Hypothermic Machine Perfusion</i> (perfusão por máquina hipotérmica)
HTK	<i>Histidine-Tryptophan Ketoglutarate</i> (histidina-triptofano-cetoglutarato)
IFD	Inativação fotodinâmica
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemases</i>
MDR	Bactérias multirresistentes
MDR-TB	Tuberculose multirresistente
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
PBPs	Proteínas de ligação à penicilina
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (solução tampão fosfato)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TFD	Terapia Fotodinâmica
UFC	Unidades formadoras de colônias
UV-C	Irradiação ultravioleta-C
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>31</b>
2.1	Fígado - anatomia, fisiologia e função .....	31
2.2	Perfusão de fígado - máquina de perfusão hepática ex situ .....	32
2.3	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	33
2.4	Radiação ultravioleta C.....	34
2.5	Terapia fotodinâmica antimicrobiana .....	37
<b>3</b>	<b>MOTIVAÇÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
4.1	Objetivo geral .....	43
4.2	Objetivos específicos.....	43
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS - EXPERIMENTOS IN VITRO .....</b>	<b>45</b>
5.1	Módulo de irradiação UV-C.....	466
5.2	Câmara de Filtragem Unidirecional .....	46
5.3	Obtenção do inóculo de <i>S. aureus</i> ATCC25293.....	48
5.3.1	Obtenção das colônias de <i>S. aureus</i> ATCC25293.....	48
5.3.2	Obtenção do inóculo planctônico de <i>S. aureus</i> ATCC25293.....	48
5.4	Contaminação das membranas e da peça de cerâmica .....	49
5.4.1	Contaminação das membranas .....	49
5.4.2	Contaminação das peças de cerâmica.....	49
5.5	Metodologia estabelecida nos testes de inativação bacteriana <i>in vitro</i> .....	50
5.5.1	Teste de inativação usando câmara de filtragem com membranas e peça de cerâmica contaminadas com <i>S. aureus</i> .....	50
5.5.2	Remanescente bacteriano após do processo de tratamento.....	51
<b>6</b>	<b>Descontaminação no modelo das membranas metálicas .....</b>	<b>53</b>
6.1	Resultados e discussão .....	53
6.2	Conclusões Parciais .....	59
<b>7</b>	<b>Descontaminação no modelo da câmara de filtragem com esponja vegetal contendo peça de cerâmica contaminada com <i>S. aureus</i>.....</b>	<b>61</b>
7.1	Resultados e discussão .....	61
7.2	Conclusões Parciais .....	63

<b>8</b>	<b><i>Combinação da Radiação Ultravioleta C e Oxacilina Sódica 500 mg associado a perfusão usando uma câmara de filtração contendo membranas contaminadas com esfregaços de colônias de S. aureus</i></b> .....	<b>65</b>
<b>8.1</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>65</b>
<b>8.2</b>	<b>Materiais e Métodos</b> .....	<b>65</b>
8.2.1	Oxacilina Sódica 500 mg.....	66
8.2.2	Teste de estabilidade do poder bactericida da Oxacilina Sódica 500 mg após da irradiação com UVC durante 4 horas .....	66
8.2.3	Concentração mínima inibitória (MIC).....	67
8.2.4	Teste de inativação combinando da radiação ultravioleta C com Oxacilina Sódica 500 mg 6,25 mg/L. ....	68
8.2.5	Teste controle PBS e Oxacilina Sódica 500 mg (6,25mg/L) por 8 e 24 horas.....	69
<b>8.3</b>	<b>Resultados e discussão</b> .....	<b>69</b>
<b>8.4</b>	<b>Conclusões Parciais</b> .....	<b>74</b>
<b>9</b>	<b><i>Descontaminação de órgãos in vitro com Terapia Fotodinâmica simulando a perfusão ex vivo do órgão usando a câmara de filtração contendo membranas contaminadas com S. aureus formando biofilme</i></b> .....	<b>75</b>
<b>9.1</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>75</b>
<b>9.2</b>	<b>Materiais e Métodos</b> .....	<b>75</b>
9.2.1	Módulo de descontaminação.....	75
9.2.2	Fotossensibilizador Azul de Metileno .....	76
9.2.3	<i>S. aureus</i> : obtenção do inóculo. Contaminação das membranas.....	77
9.2.4	Fotodegradação do Custodiol® e Custodiol® com azul de metileno 0,01% usando luz vermelha (660nm).....	77
9.2.5	Citotoxicidade de Custodiol® com azul de metileno e irradiado em células de mamíferos (fibroblastos).....	78
9.2.6	Teste de inativação fotodinâmica usando luz vermelha (660 nm) do Custodiol® com azul de metileno 0.01% usando câmara de filtração com membranas contaminadas com esfregaços de colônias de <i>S. aureus</i> .....	79
<b>9.3</b>	<b>Resultados e discussão</b> .....	<b>79</b>
<b>9.4</b>	<b>Conclusões Parciais</b> .....	<b>87</b>
<b>10</b>	<b><i>Descontaminação de fígados de ratos Wistar machos simulando a perfusão ex vivo do órgão usando a radiação ultravioleta C para a inativação de S. aureus no líquido circulante</i></b> .....	<b>89</b>
<b>10.1</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>89</b>
<b>10.2</b>	<b>Materiais e Métodos</b> .....	<b>89</b>
10.2.1	Sistema de perfusão do fígado combinado com modulo de irradiação UV-C.....	89
10.2.2	Linhagem animal .....	90
10.2.3	Obtenção do inóculo para indução da infecção.....	90
10.2.4	Modelo animal de infecção sistêmica.....	91

10.2.5	Cirurgia para extração de fígado e canulação para perfusão .....	92
10.2.6	Teste de descontaminação de fígado de ratos Wistar machos simulando a perfusão <i>ex vivo</i> do órgão usando a radiação ultravioleta c para a inativação de <i>S. aureus</i> no líquido circulante .....	93
10.2.7	Teste de propriedades ópticas do Custodiol e sangue .....	94
<b>10.3</b>	<b>Resultados e discussão .....</b>	<b>95</b>
<b>10.4</b>	<b>Conclusões Parciais .....</b>	<b>102</b>
<b>11</b>	<b><i>Considerações finais</i> .....</b>	<b>103</b>
<b>12</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>105</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>107</b>
	<b>ANEXO A - Calibração do sistema de irradiação e dosimetria UV- C.....</b>	<b>119</b>
	<b>ANEXO B.....</b>	<b>122</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O transplante é um procedimento cirúrgico eficaz para a falência de órgãos em estágio avançado, que consiste na reposição de um órgão (coração, pulmão, rim, pâncreas, fígado) ou tecido (medula óssea, ossos, córneas) de uma pessoa doente (receptor), por outro órgão ou tecido compatível de um doador vivo ou morto, com o intuito de devolver a funcionalidade do órgão e garantir a sobrevivência do receptor.

Existem dois tipos de transplante: o transplante inter-vivos onde sua efetivação é possível apenas para alguns órgãos podendo ser doado um dos rins, parte do fígado, parte do pulmão e ainda parte da medula óssea; nesse caso, segundo a legislação, somente podem ser doadores parentes até o quarto grau e cônjuges, aqueles que não são parentes só podem fazer a doação com autorização judicial; e o transplante de doador falecido, aonde somente é considerado quando o doador recebe o diagnóstico de morte encefálica e o órgão alvo a ser doado fisiologicamente normal, além de contar com o consentimento dos familiares e do receptor.<sup>1</sup>

O transplante de órgãos sólidos vem sendo considerado o tratamento de eleição para melhorar a qualidade de vida de pessoas que apresentam doenças crônicas de caráter irreversível que afetam rim, pâncreas, fígado, coração e pulmão. Na atualidade, a demanda de transplantes de órgãos sólidos no mundo tem um crescimento elevado devido ao aumento de doenças que causam a falência orgânica terminal.<sup>2</sup> Entre as doenças mais comuns encontram-se: insuficiência cardíaca terminal,<sup>3</sup> enfermidade pulmonar obstrutiva crônica,<sup>4</sup> cirrose hepática e fibrose hepática crônica,<sup>5</sup> encefalopatia hepática, varizes esofágicas hemorrágicas, insuficiência hepática aguda, hepatites/necroses fulminantes, enfermidades malignas como o carcinoma hepatocelular, hepatoblastoma, hemangioma, colangiocarcinoma,<sup>6</sup> esteatohepatite não-alcoólica (EHNA), cirroses alcoólica, hepatite C,<sup>7</sup> insuficiência renal crônica, glomerulonefrite, enfermidade renal policística, malformações congênitas, lúpus,<sup>8</sup> entre outras. Nesses casos, o transplante de órgãos pode ser a única opção de tratamento para a sobrevivência do paciente.

Segundo o Observatório Global sobre Doação e Transplante (GODT),<sup>9</sup> em 2019 foram transplantados 153.863 órgãos sólidos, sendo 100.097 rins, 35.784 fígados, 8.722 corações, 6.800 pulmões, 2.323 pâncreas e 137 intestinos. No entanto, estes números correspondem a apenas cerca de 10% das necessidades globais.<sup>9</sup> Dados fornecidos pela Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO) mostram que até dezembro de 2020, 43.642 pacientes ativos foram reportados na lista de espera para transplante de órgãos no Brasil, sendo São Paulo a

cidade com o maior número de pacientes registados (18.891).<sup>10</sup> No Brasil, 26.862 pacientes estão à espera de uma doação de rim, e 1.031 para doação de fígado, representando 61,6% e 2,4%, respectivamente, do total de órgãos sólidos.<sup>10</sup>

O fígado representa um dos principais órgãos sólidos transplantados. A preservação dinâmica é realizada através da perfusão *ex vivo*,<sup>11</sup> permitindo que a viabilidade de transplante seja avaliada numa base contínua e os órgãos marginais sejam preservados para transplante. O efeito cumulativo desses benefícios inclui a expansão da reserva de doadores, menor risco de não funcionamento primário e extensão do período de preservação seguro.

A máquina de perfusão hepática *ex vivo* ainda está em fase de estudo clínico para transplante de fígado,<sup>12</sup> sendo implementada atualmente na prática clínica de diversos centros transplantadores da Europa em projetos de pesquisa.<sup>13-14</sup>

Há vários aspectos que tornam o transplante de órgãos um processo desafiador tanto para o doador como para o receptor. Entre eles estão longas listas de espera, infecções, incompatibilidade entre doador e receptor,<sup>15-16</sup> etc., sendo a disponibilidade de órgãos um dos principais limitantes, levando ao aumento da taxa de mortalidade dos pacientes registrados na lista de espera.<sup>17</sup>

A escassez de órgãos levou a muitos programas de transplantes ampliar seus critérios de aceitação de doadores. O uso de enxertos marginais ou limítrofes tem sido uma solução que proporciona uma expansão imediata do número de órgãos para transplantes.<sup>18</sup>

A colonização ou infecção por microrganismos apresenta mais um desafio para o transplante de órgãos. Quando o órgão do doador está potencialmente infectado com microrganismos patogênicos, ele é geralmente descartado, diminuindo assim o número de órgãos disponíveis nas redes de transplante.<sup>19</sup> Adicionalmente, a resistência antimicrobiana e os microrganismos multirresistentes (*multi-drug resistant, MDR*), particularmente presentes em ambientes hospitalares, tornam o desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de antibióticos para a descontaminação de órgãos de grande relevância e urgência. Exemplos que podem ser citados de microrganismos de interesse para a resistência antimicrobiana são: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA), *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC), NDM-1, MDR-TB (tuberculose multirresistente), *Actinobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, e *Proteus sp.*<sup>20-24</sup>

A possibilidade de desenvolver novas gerações de antibióticos capazes de combater as superbactérias está muito longe de ser uma realidade. Assim, a melhor alternativa é minimizar

o uso indiscriminado de antibióticos, utilizando-os apenas em situações extremas, juntamente com a procura de tratamentos alternativos.

Uma das alternativas com efeito germicida é a irradiação ultravioleta C (UV-C), dada a capacidade desta técnica para inativar microrganismos sem necessidade de substâncias químicas. Utilizada fluência e comprimento de onda adequada, o UV-C pode produzir efeito antimicrobiano, perturbando as moléculas de DNA ou RNA do alvo, tornando-as incapazes de se reproduzir,<sup>25-26</sup> além de um mecanismo de inativação direta, principalmente através da destruição da parede celular e da membrana.<sup>27</sup> A elevada energia UV-C do fóton induz danos em todas as biomoléculas, principalmente em lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos, resultando em ação sobre alvo biológico não específico. Tal utilização tem-se revelado cada vez mais eficaz no tratamento de água;<sup>28-34</sup> na desinfecção de alimentos<sup>35-41</sup> e superfícies.<sup>42-44</sup>

A radiação ultravioleta-C pode tornar-se uma alternativa para o tratamento de enxertos contaminados quando combinada com a perfusão *ex vivo* do órgão. A irradiação UV-C é realizada apenas no perfusato, sem irradiação direta do tecido, evitando assim qualquer dano direto ao órgão.<sup>45</sup> Estudos já comprovaram que a perfusão *ex vivo* do órgão melhora as condições metabólicas do enxerto e o sucesso do transplante, incluindo uma diminuição da carga de microrganismos do órgão.<sup>46-59</sup> O desenvolvimento instrumental e do protocolo de irradiação UV-C associado à máquina de perfusão *ex vivo* de pulmão e rim foi reportado recentemente pelo nosso grupo.<sup>60-62</sup>

Outra técnica muito bem conhecida usada na inativação de microrganismos patogênicos é a terapia fotodinâmica (TFD) ou também chamada inativação fotodinâmica (IFD) ou terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) nos estudos que visam o controle microbiológico. Esta técnica envolve o uso de um fotossensibilizador (FS) que quando é ativado por luz no comprimento de onda específico e na presença de oxigênio molecular é capaz de interagir com outras moléculas presentes no meio, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais são as principais responsáveis por induzir a morte de microrganismos e células tumorais.<sup>63-64</sup> A aplicação desta técnica obteve ótimos resultados na destruição de células tumorais de diversos tipos, preservando os tecidos saudáveis,<sup>63-64</sup> no tratamento de infecções microbianas de diferentes naturezas como candidíase oral,<sup>65-66</sup> feridas contaminadas<sup>67-68</sup> e micoses de unhas,<sup>69</sup> demonstrando ser um método promissor no controle de agentes patógenos.

O principal objetivo do trabalho é verificar através do desenvolvimento de testes *in vitro* e *ex vivo*, a viabilidade do uso de técnicas ópticas para a eliminação ou redução de *S. aureus* no perfusato e avaliar a carga bacteriana remanescente em dois tipos de materiais diferentes, simulando condições distintas de adesão de bactérias/materiais e barreiras mecânicas e no

fígado *ex vivo*. A abordagem da radiação UV-C e a inativação fotodinâmica (IFD) serão descritas detalhadamente nas seções subsequentes.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Fígado - anatomia, fisiologia e função

O fígado é um órgão triangular que se estende ao longo da cavidade abdominal abaixo do diafragma, constituído por tecidos moles marrom-rosados, encapsulados por tecido conjuntivo.<sup>70</sup> É a maior glândula do corpo responsável por aproximadamente 2,5% do total de peso corporal (cerca de 1500 g no adulto).<sup>70</sup>

Encontra-se dividido em dois lobos: direito e esquerdo, que são separados anteriormente pela linha de inserção do ligamento falciforme, posteriormente pela fissura do ligamento venoso e inferiormente pela fissura do ligamento redondo.<sup>71</sup> O ligamento venoso é um remanescente do ducto venoso do feto, origina-se do ramo esquerdo da veia porta e se une com a entrada da veia hepática esquerda para a veia cava inferior.<sup>72</sup> O ligamento redondo é um remanescente da veia umbilical do feto, corre na borda livre do ligamento falciforme desde o umbigo até a borda inferior do fígado e se une ao ramo esquerdo da veia porta.<sup>72</sup> Pequenas veias que acompanham ao fundo conectam a veia porta às veias ao redor do umbigo que ficam ingurgitadas quando a pressão venosa portal aumenta.<sup>72</sup> O lobo direito tem aproximadamente seis vezes o tamanho do esquerdo e acomoda o lobo caudado na fase posterior do corte e o lobo quadrado na fase inferior (Figura 1).<sup>72</sup>

Funcionalmente o fígado pode ser dividido em quatro setores e oito segmentos que correspondem ao suprimento sanguíneo e drenagem biliar.<sup>73</sup> A unidade funcional básica do fígado é o lóbulo hepático, estrutura cilíndrica de 0,8 a 2 mm de diâmetro, constituído principalmente por numerosas placas hepatocelulares, cada uma tem uma espessura geralmente formada por duas células, e entre as células adjacentes encontram-se pequenos canálculos biliares que desaguam nos dutos biliares nos septos fibrosos que separam os lóbulos hepáticos adjacentes.<sup>74</sup>

As funções básicas do fígado podem ser divididas em: funções vasculares para armazenamento e filtração do sangue; funções metabólicas relacionadas com a maioria dos sistemas metabólicos do organismo e funções secretoras e excretoras responsáveis pela formação de bile que flui pelos dutos biliares para o trato gastrointestinal.<sup>74</sup> O fígado, além de secretar a bile necessária para a absorção das gorduras dietéticas, realiza outras funções vitais de muita importância entre as que se encontram: o metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas, processamento de fármacos e hormônios, excreção de bilirrubina e sínteses dos sais biliares.<sup>74</sup> O fígado é o local principal de armazenamento, não só do glicogênio, se não também

para determinadas vitaminas (A, B<sub>12</sub>, D, E e K) e minerais (ferro e cobre) que são liberados pelo fígado quando são necessários em outras partes do corpo.<sup>74</sup> Além disso, se encarrega da fagocitose de eritrócitos envelhecidos, leucócitos e algumas bactérias assim como na síntese da forma ativa da vitamina D.<sup>72</sup>

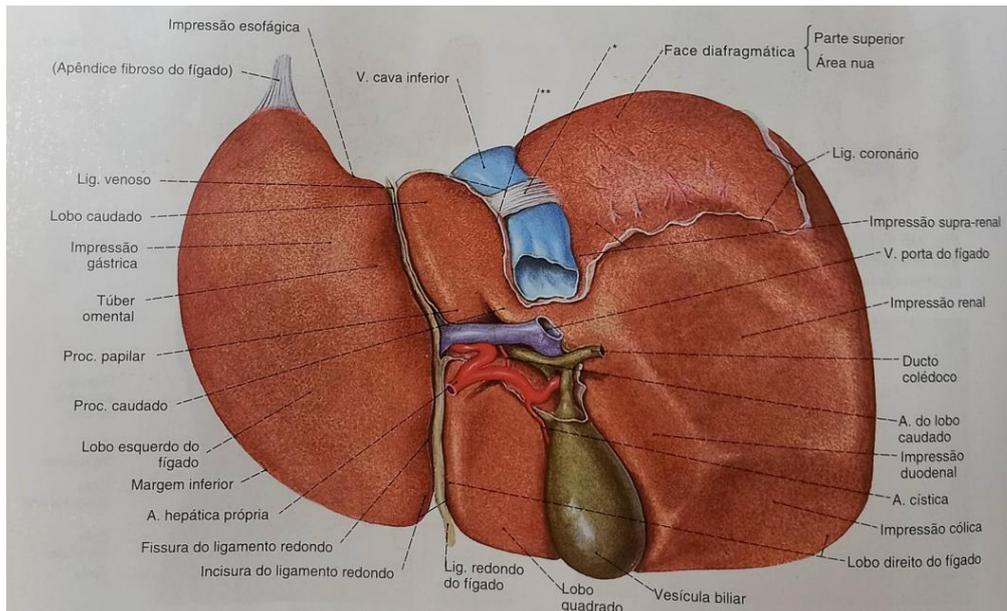


Figura 1 - Vista posterior do fígado: \*ligamento da veia cava; \*\*Limites do recesso superior da bolsa omental

Fonte: Adaptada de SOBOTTA.<sup>75</sup>

## 2.2 Perfusão de fígado - máquina de perfusão hepática *ex situ*

A utilização da máquina de perfusão ainda está em fase de investigação para transplante de fígado em humanos. Contudo, já existem estudos avaliando a viabilidade técnica desses novos protocolos, tendo sido realizado em 2009 o primeiro ensaio clínico de transplante de fígado submetido à máquina de perfusão hipotérmica (MPH). Antes disso, o transplante bem-sucedido de fígados preservados com MPH só havia sido relatado em modelos animais.<sup>76</sup> Esse estudo abriu as portas para o delineamento de outros ensaios clínicos envolvendo máquinas normotérmicas e subnormotérmicas, todos atestando os benefícios que a perfusão *ex vivo* proporciona aos órgãos e, conseqüentemente, aos pacientes.<sup>77-82</sup>

No transplante de fígado para doadores com morte encefálica, o órgão passa por um período de preservação estática no gelo para ser transportado (*end-ischaemic*) até o centro

transplantador (*ex vivo*).<sup>83</sup> Após preparo do órgão e inserção das cânulas vasculares e biliares inicia a perfusão do órgão, submetendo-o à preservação dinâmica com o líquido de preservação mantido a 37° C quando a perfusão hepática homotérmica ou aproximadamente a 10° C na perfusão hepática hipotérmica<sup>84</sup> Desta forma, o órgão a ser transplantado recebe o fluxo contínuo de solução oxigenada por meio da vasculatura,<sup>85</sup> melhorando assim a preservação da microcirculação hepática, incorporando nutrientes e oxigênio para o metabolismo celular e remove os resíduos metabólicos tóxicos,<sup>84</sup> limitando o dano isquêmico aos órgãos dos doadores permitindo seu recondicionamento antes do transplante beneficiando aos órgãos com qualidade limítrofe.<sup>86</sup> Outras modalidades de perfusão como a subnormotérmica e as combinações de técnicas de perfusão tiveram os primeiros estudos pré-clínicos e clínicos publicados.<sup>87-89</sup>

O desenvolvimento de máquinas viáveis e práticas para perfusão de fígados humanos já está se tornando realidade e representa o futuro do transplante de fígado; espera-se que mais modelos e protocolos sejam testados nos próximos anos e passem a ter utilização clínica rotineira.

O Custodiol® ou *Histidine-Tryptophan Ketoglutarate* (HTK) é a solução de perfusão de caráter intracelular clinicamente aprovada para lavagem e preservação utilizada para diferentes órgãos sólidos, como coração, fígado, rins, pâncreas e pulmões submetidos à HMP.<sup>90</sup> A solução está composta por histidina, triptofano, alfacetoglutarato, manitol e baixas concentrações de sódio, cálcio e potássio.<sup>90</sup> A preservação do órgão ocorre devido à redução máxima do metabolismo através da ação celular, contando com um agente tamponador altamente concentrado que promove o equilíbrio entre as concentrações intra- e extracelulares de sódio favorecendo assim, a melhor tolerância destes órgãos à isquemia prolongada, bem como para órgãos marginais.<sup>90</sup> Devido à sua alta tolerância sistêmica, pode ser usada em todo tipo de procedimentos cirúrgicos, como cirurgias do coração, ressecção tumoral de rins e doação de enxertos hepáticos, motivo pelo qual foi escolhida.<sup>90</sup>

### **2.3 *Staphylococcus aureus***

A cepa bacteriana escolhida para este estudo foi o *S. aureus*, um patógeno humano importante que causa várias infecções que vão desde infecções simples à mais graves e letais, e é considerado uma das espécies de maior interesse médico porque é o principal agente etiológico da bacteremia em todo o mundo.<sup>91-96</sup>

*S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva que pertence ao gênero *Staphylococcus* e à família *Micrococcaceae* possuindo forma de cocos distinguida pela sua pigmentação ouro, com um diâmetro aproximado de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$ , caracterizam-se por serem microrganismos não esporulados, não encapsulados e anaeróbios facultativos.<sup>97-99</sup> Podem apresentar diversos arranjos que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, aglomeradas ou agrupadas irregularmente (com aspecto semelhante a um cacho de uvas) devido a sua divisão celular que ocorre em diversos planos.<sup>100</sup> *S. aureus* podem se encontrar no ambiente e também na flora humana normal localizada na pele e membranas mucosas da boca, da orofaringe, das fossas nasais e do intestino da maioria dos indivíduos saudáveis.<sup>101</sup> Normalmente não causa infecção na pele saudável; no entanto, caso ocorra a entrada na corrente sanguínea ou nos tecidos internos, essas bactérias podem causar uma variedade de infecções potencialmente graves.<sup>102-103</sup> A transmissão é normalmente a partir do contato direto, entretanto, algumas infecções envolvem outros métodos de transmissão.<sup>104</sup>

O *S. aureus* é um importante patógeno bacteriano humano que causa uma grande variedade de manifestações clínicas.<sup>105-106</sup> As infecções são comuns tanto em ambientes comunitários quanto hospitalares e o tratamento continua sendo um desafio devido ao surgimento de cepas multirresistentes como o MRSA.<sup>107-109</sup>

## 2.4 Radiação ultravioleta C

Os raios UV são radiações emitidas pelo sol e compreendem de 3% a 5% de toda radiação solar que chega à superfície terrestre.<sup>110</sup> A radiação UV solar que atinge a superfície terrestre contém comprimentos de onda de 290-380 nm, dos quais uma quantidade considerável está na UVA. O limite superior do comprimento de onda do UV é onde começa a visão humana (380 nm) e o limite inferior do comprimento de onda é de 10 nm; assim, todo o UV é invisível para os seres humanos.<sup>110</sup> A radiação ultravioleta UV (100 a 400 nm), encontra-se dividida em três regiões espectrais que incluem: UV-C (200 a 280 nm), UV-B (280 a 315 nm), UV-A (315 a 400 nm)<sup>111-112</sup> como se mostra na Figura 2.

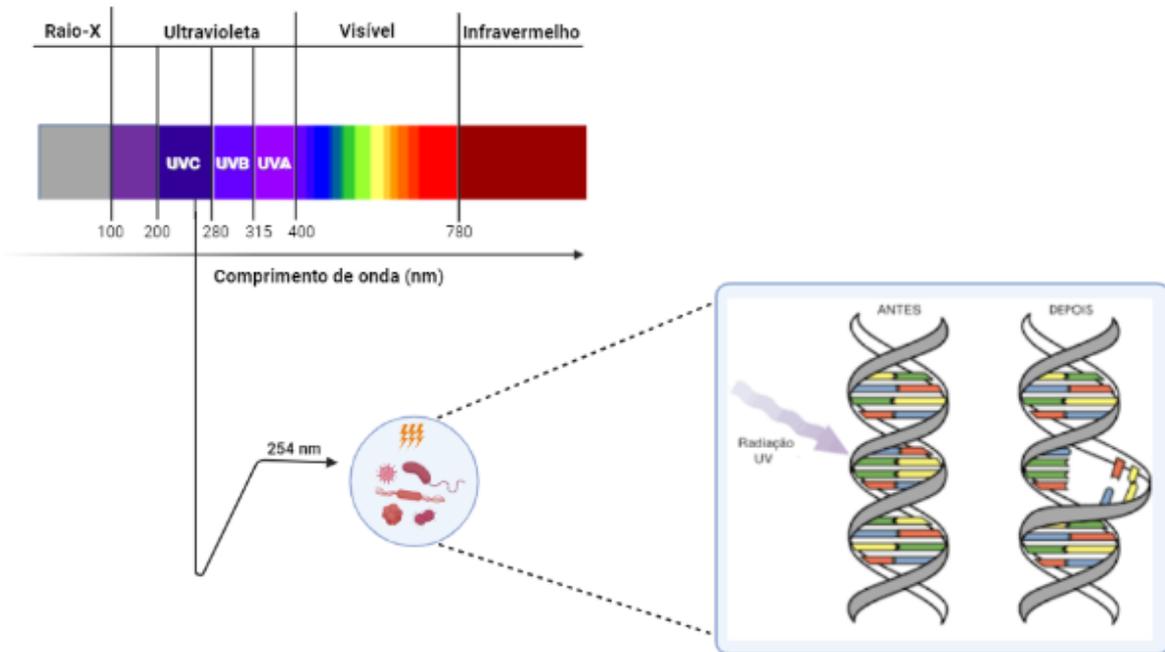


Figura 2 - Imagem ilustrativa do espectro eletromagnético da luz ultravioleta e mecanismo de ação da radiação ultravioleta C UV-C: dimerização da timina e efeito mutagênico da radiação ultravioleta no material genético.

Fonte: Adaptada de Google imagens

Dependendo do comprimento de onda, da intensidade e da duração da iluminação, distintos serão os efeitos biológicos produzidos pela irradiação UV. A faixa germicida ótima para a inativação de microrganismos é a UV-C, pois é absorvida pelo material genético das bactérias, fungos e vírus, tornando-os incapazes de se replicar e de causar doenças<sup>113</sup> (Figura 3).

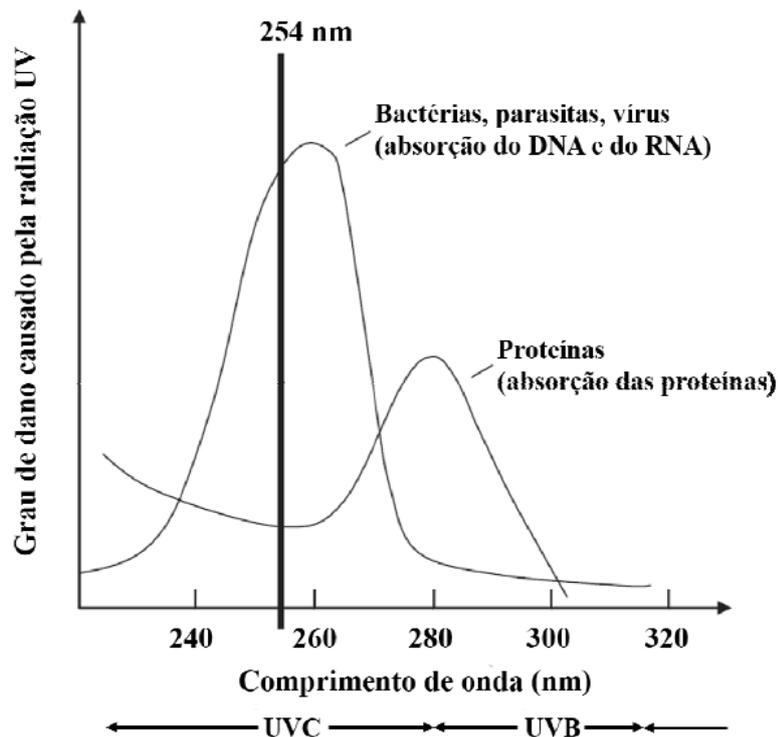


Figura 3 - Imagem do desenho esquemático do grau de dano causado pela irradiação UV aos agentes patogênicos (bactérias, parasitas, vírus) e às proteínas nos diferentes comprimentos de onda.

Fonte: CORREA.<sup>114</sup>

O processo de destruição inicia quando os microrganismos são expostos à radiação, devido aos danos causados ao material genético das células, sendo a principal causa da morte celular.<sup>115</sup> O material genético é constituído pelos ácidos nucleicos DNA/RNA, que são formados por nucleotídeos, os quais, por sua vez, são constituídos por um radical fosfato, por um açúcar (pentose: ribose e desoxirribose) e por uma base nitrogenada (purinas: adenina e guanina; pirimidinas: timina, citosina e uracila).<sup>115</sup> Quando a radiação UV penetra através das células é absorvida pelas purinas e pirimidinas do DNA/RNA, que entram em um estado mais reativo, formando dímeros de pirimidina.<sup>115</sup> A dimerização da timina (Figura 2) é o principal efeito mutagênico da radiação UV, que acontece quando se ligam duas timinas próximas de uma mesma fita de DNA/RNA prejudicando a estrutura do material genético.<sup>115</sup> Esse reordenamento na informação genética gera uma nova configuração que não é conhecida pelas células e bloqueia a replicação do DNA/RNA.<sup>115</sup> A consequência desse processo constitui em morte celular, sendo este o dano fotoquímico mais frequente que interfere na capacidade de replicação dos microrganismos após do contato com a radiação UV.<sup>115</sup>

Além do efeito antimicrobiano produzido pela irradiação UV-C quando são perturbadas as moléculas de DNA ou RNA do alvo,<sup>115</sup> existe um mecanismo de inativação direta através da

perturbação da parede celular e da membrana<sup>27</sup> induzido pela elevada energia UV-C do fóton provocando danos nas biomoléculas principalmente em lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos, resultando num alvo biológico não específico.

Para estudos que envolvem o uso de luz ultravioleta, é possível utilizar lâmpadas com diferentes perfis de emissão. As lâmpadas do tipo ultravioleta emitem luz na região que compreende 100-350 nm, com emissão preferencial entre 100-280 nm, com emissão preferencial na região entre 220-270 nm (Figura 4)

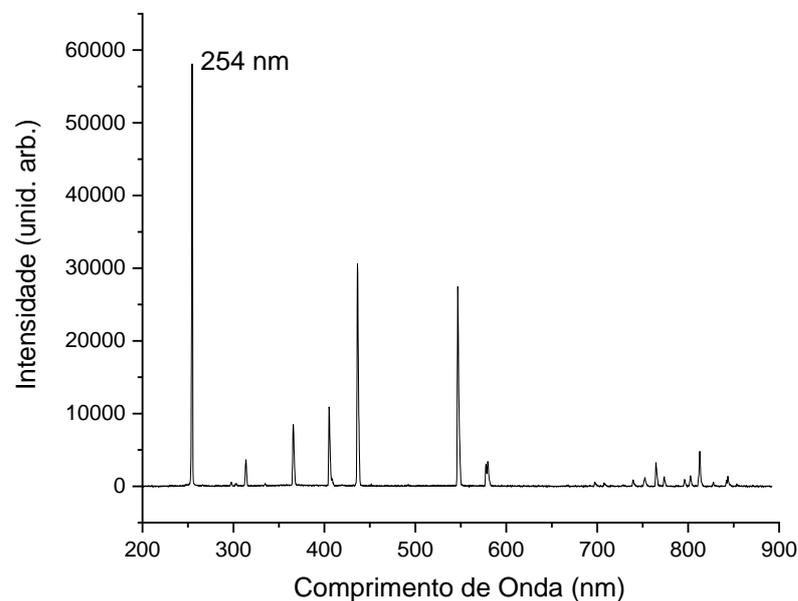


Figura 4 - Imagem do espectro da lâmpada UV-C utilizada nos experimentos desenvolvidos.

Fonte: Elaborada pela autora

## 2.5 Terapia fotodinâmica antimicrobiana

Relata-se em textos antigos que desde tempos da pré-história diversas culturas como a egípcia, chinesa, hindu e grega usavam a exposição à luz solar como agente terapêutico para tratar doenças de pele como feridas, vitiligo e psoríase.<sup>116</sup> Na Grécia antiga numa cidade chamada Heliópolis, conhecida como a cidade do Sol, existia inúmeras templos de cura pela luz onde se praticava a terapia solar através de suas componentes espectrais.<sup>116-117</sup> Os antigos egípcios desenvolveram a base da cromoterapia para tratar doenças físicas, mentais e

emocionais valendo-se das qualidades terapêuticas da luz, partindo desde o fato de que a cor vermelha estimula e a cor azul relaxa e revigora.<sup>116-118</sup>

Em 1900 Raab fez o primeiro relato científico da associação da luz com uma molécula fotossensível, quando expôs uma cultura de *Paramecium caudatum* contendo acridina à luz branca e constatando que a acridina vermelha, na presença de luz, era capaz de causar sua morte.<sup>119</sup> Sendo que, com a observação da fluorescência, postulou que a citotoxicidade era causada pela transferência de energia da luz para a molécula fotossensível, a qual era capaz de converter os produtos da fluorescência em atividade tóxica para células, similar ao processo de fotossínteses pelas plantas após da absorção da luz pela clorofila.<sup>119</sup>

Nesse mesmo ano, o neurologista francês Jean Prime fez o primeiro relato sobre o efeito da associação de luz e fotossensibilizador (FS) em humanos. Relatou a indução da dermatite quando a eosina é administrada por via oral em paciente com epilepsia e este se expõe à luz solar.<sup>120</sup> Embora, não foi até 1903, que foi outorgado o Prêmio Nobel em Física ao dinamarquês Niels Finsen pelo uso da fototerapia com luz ultravioleta para tratamento de tuberculose cutânea.<sup>121</sup>

Apesar dos resultados obtidos na aplicação da TFD no tratamento de infecções microbianas, o uso dessa técnica perdeu força com o desenvolvimento das penicilinas,<sup>122-123</sup> passando a um segundo plano as descobertas de Raab. No entanto, com o desencadeamento de cepas microbianas resistentes aos antibióticos, foi necessária a utilização de novas técnicas para a inativação microbiana, retomando assim o uso da TFD como alternativa para a inativação de bactérias Gram positiva e Gram negativa, fungos e vírus.<sup>124-126</sup>

O mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) ou também nomeada Inativação Fotodinâmica (IFD), empregada para o controle e inativação de microrganismos, combina o uso três elementos: o FS, a luz no comprimento de onda adequado para ativação do FS, e o oxigênio (O<sub>2</sub>) presente no meio.<sup>127</sup> A ação conjunta desses elementos promove a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) como o os radicais livres (tipo 1) e o oxigênio singleto (tipo 2), capazes de induzir a morte das células.<sup>128-130</sup> Os processos físico-químicos e mecanismo de ação envolvidos na TFDa são apresentados na Figura 5.

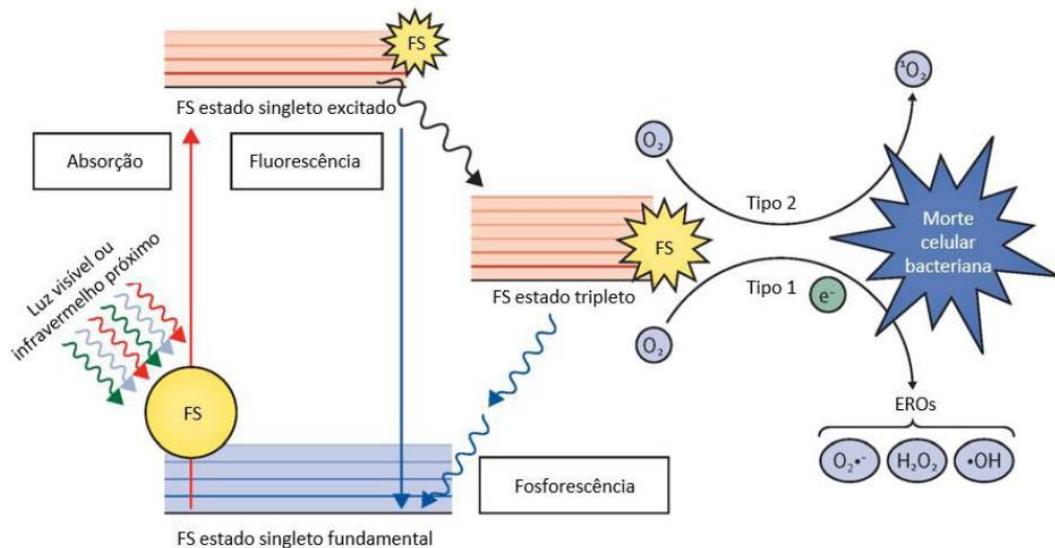


Figura 5 - Representação esquemática do mecanismo de ação da TFDa por meio do diagrama de Jablonski.

Fonte: Adaptada de WAINWRIGHT.<sup>131</sup>

Quando a molécula do FS está em equilíbrio termodinâmico, encontra-se no estado fundamental singlete ( $S_0$ ). Ao absorver um fóton de luz incidente de comprimento de onda adequado, a molécula sofre uma transição para estados singletos excitados ( $S_n$ ) e voltar para o estado excitado de menor energia ( $S_1$ ). O retorno de  $S_1$  para  $S_0$  pode acontecer por dois processos: a molécula de FS pode decair diretamente ao estado fundamental perdendo energia pela emissão de um fóton, ou seja, emitindo luz, processo chamado fluorescência; ou por processo não-radiativo, a relaxação vibracional com geração de calor. No estado  $S_1$  a molécula de FS ainda pode sofrer um cruzamento inter-sistema para um estado tripleto excitado ( $S_1 \rightarrow T_1$ ), processo que envolve a inversão de *spin* eletrônico.<sup>116</sup> Neste estado tripleto, a molécula pode decair para o estado fundamental emitindo fosforescência, processo que envolve a transição entre os estados tripleto e singlete fundamental ( $T_1 \rightarrow S_0$ ) ou pode ainda sofrer duas reações distintas:

- A) Ocorre através da transferência de elétron ou hidrogênio entre o FS no estado tripleto excitado e moléculas vizinhas ou estruturas biológicas gerando radicais livres que por sua vez reagem com o oxigênio em estado fundamental produzindo as EROs. Entre as EROs produzidas estão o ânion superóxido, o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio. Esse processo é denominado reação do tipo 1.<sup>116</sup>

B) Ocorre através da transferência de energia do FS no estado tripleto excitado para o oxigênio molecular ( $^3\text{O}_2$ ) presente no microambiente, gerando oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) agente altamente reativo capaz de oxidar biomoléculas. Processo chamado de reação tipo 2.<sup>116-117, 132-133</sup>

Durante a TFDa podem acontecer os dois tipos de reações simultaneamente, o que define a proporção em que elas vão acontecer é influenciada pelo FS utilizado, do substrato, da concentração de oxigênio presente e da afinidade do FS com o substrato.<sup>127,134</sup> Em ambos os mecanismos o produto fotodinâmico gerado (tanto as EROs originadas nas reações tipo 1 quanto o oxigênio singleto originado nas reações tipo 2) são responsáveis pela morte celular.<sup>134</sup>

Para obter resultados satisfatórios na TFD é necessário que o FS cumpra com algumas propriedades que fazem dele o FS ideal.<sup>135</sup> Dentre essas características fotofísicas e fotoquímicas encontram-se: alta solubilidade, estável em solução aquosa a pH fisiológico, alta absorção nos comprimentos de 600 a 850 nm, seletivo, alta eficiência quântica para produzir oxigênio singleto e/ou EROs, ausência de efeitos mutagênicos e carcinogênicos, ter baixa toxicidade no escuro e a níveis terapêuticos e ser metabolizado rapidamente.<sup>132-133, 136</sup>

### 3 MOTIVAÇÃO

Brasil é referência na área de transplantes, sendo o segundo país maior transplantador de órgãos no mundo.<sup>137</sup> Atualmente, o maior limitante para a redução das listas de espera do transplante é a escassez de órgãos. O principal fator que contribui negativamente à disponibilidade de órgãos é que muitos dos enxertos são descartados devido à contaminação por microrganismos patogênicos que, na maioria dos casos, são resistentes aos antibióticos e resulta impossível serem eliminados com antibióticos, trazendo como consequência o aumento da mortalidade de pacientes em lista de espera para realização de transplantes.

Conhecendo a eficácia e segurança das técnicas de perfusão para rins<sup>53-56</sup> e fígados<sup>138-140</sup> no mundo inteiro, a conjugação da radiação UV-C durante este procedimento de transplante é uma alternativa promissora que pode resultar em um aumento da disponibilidade de enxertos e, conseqüentemente, em uma diminuição do número de mortes de pacientes da lista de espera.

Estudos recentes demonstraram a eficácia da utilização da irradiação UV-C durante a perfusão pulmonar *ex vivo* (EVLP) para a inativação do vírus da hepatite C (HCV).<sup>60-61</sup> O primeiro estudo foi o desenvolvimento e validação do método num estudo pré-clínico em suínos, com o doador positivo para HCV e o receptor negativo onde a irradiação UV-C e a TFD com azul de metileno foram investigadas como métodos de inativação durante o EVLP.<sup>60</sup> No estudo foi observada redução da carga de HCV em ambas as terapias fotônicas com maior redução no perfusato, diminuição da resposta no pulmão doador e não foram observadas diferenças estruturais nem metabólicas relevantes nos grupos tratados em comparação com apenas o EVLP.<sup>60</sup> O método UV-C foi investigado em um ensaio clínico que demonstrou o mesmo resultado de diminuição da carga de HCV nos pulmões do doador, atrasando o estabelecimento da infecção no receptor e reduzindo o ciclo do medicamento antiviral.<sup>61</sup> Os autores também relatam a segurança do procedimento fotônico, sem alterações da fisiologia pulmonar após o transplante.<sup>61</sup>

Em outro estudo realizado recentemente, Goenaga-Mafud *et al.* descreveram a eficácia do UV-C combinado com um dispositivo de perfusão *ex vivo* do rim para a inativação do *S. aureus* em modelos *in vitro* e *ex vivo*.<sup>62</sup> A redução bacteriana no perfusato circulante, utilizando o modelo *in vitro*, resultou em até 5 log de redução das células bacterianas em comparação com a perfusão sem UV-C.<sup>62</sup> Para o modelo de rim suíno *ex vivo*, a redução bacteriana foi de 4 log,

mostrando o desafio de alcançar uma maior redução bacteriana no perfusato quando há um foco de infecção não tratada, atuando como uma fonte bacteriana ativa.<sup>62</sup>

O desenvolvimento de tecnologias na área do transplante de órgãos sólidos busca o aprimoramento dos procedimentos visando o aumento da qualidade do enxerto, as máquinas de perfusão *ex vivo* são um exemplo. A manutenção do órgão com perfusão dinâmica do líquido de preservação já comprovadamente melhora as condições celulares e teciduais, minimizando os efeitos causados pela ausência da circulação sanguínea (colocar referência). A contaminação microbiana do enxerto é outro fator limitante no transplante e vem se tornando um tópico de ainda mais interesse em decorrência da resistência antimicrobiana. Alguns estudos já demonstraram a efetividade de tecnologias fotônicas, UV-C e terapia fotodinâmica antimicrobiana, associadas a perfusão *ex vivo* de pulmão HCV positivo. Mais recentemente, a irradiação UV-C também demonstrou o potencial para a inativação de *S. aureus* no perfusato em máquina de perfusão renal. No entanto, os três estudos apontam a ineficácia na descontaminação do órgão por não haver o tratamento direto do órgão e a pobre ação na liberação dos vírus e das células bacterianas presentes nos tecidos. Desta forma, o presente estudo avaliou em diferentes modelos *in vitro* e em um modelo *ex vivo* de fígado de rato o efeito da perfusão e dos métodos fotônicos na contaminação remanescente no foco ativo.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

- Avaliar a viabilidade do uso da Radiação Ultravioleta C e Terapia Fotodinâmica para a descontaminação do perfusato e do foco ativo infectado em modelos *in vitro* e *in vivo*, com diferentes condições de aderência bacteriana, irradiando o líquido circulante no processo de perfusão *ex vivo* do órgão.

### 4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade do uso da Radiação Ultravioleta C e da Terapia Fotodinâmica associados à perfusão em modelos *in vitro* na inativação de *Staphylococcus aureus* em membranas metálicas com contaminação da bactéria em suspensão ou em colônias.
- Avaliar a eficiência da radiação UV-C (254 nm) na inativação de *S. aureus* no modelo *in vitro* de circulação em esponja *Luffa cylindrica* com peças cerâmicas contaminadas com *S. aureus* em suspensão.
- Avaliar a combinação da radiação UV-C e oxacilina na inativação de *S. aureus* no modelo *in vitro* de circulação em membranas metálicas.
- Avaliar a eficiência da radiação UV-C na inativação de *S. aureus* no perfusato e na carga bacteriana residual no modelo *ex vivo* de fígado de ratos Wistar.



## 5 MATERIAIS E MÉTODOS - EXPERIMENTOS *IN VITRO*

Este capítulo tem a função de descrever os materiais e métodos que serão comuns aos capítulos que descrevem os diferentes experimentos apresentados nesta tese. Nele, serão descritos os componentes do sistema utilizado para a descontaminação bacteriana simulando a perfusão do órgão *ex vivo*: o módulo de irradiação, a câmara de filtragem que simula o órgão assim como as técnicas de obtenção do inóculo e contaminação dos materiais utilizados para a simulação de tecidos que se encontram dentro do órgão, comuns aos capítulos 6, 7, 8 e 9. Outros materiais e métodos, mais específicos a um experimento em particular, estão descritos nos respectivos capítulos.

O sistema utilizado para a descontaminação bacteriana simulando a perfusão *ex vivo* do órgão está constituído por vários dispositivos: uma fonte de irradiação UV-C para a inativação dos microrganismos que se encontram no meio circulante; uma bomba peristáltica encarregada de manter a circulação do líquido por todo o sistema; e uma câmara de filtragem unidirecional que simularia o órgão; como se representa na Figura 6.

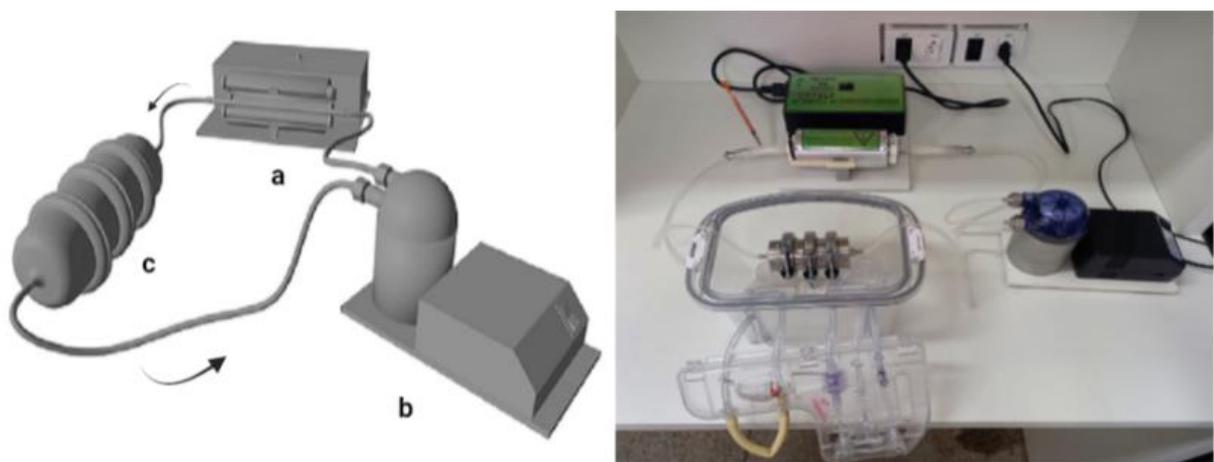


Figura 6 - Imagem ilustrativa dos componentes do sistema utilizado para a inativação bacteriana simulando a perfusão *ex vivo* do órgão: a: Fonte de irradiação de luz UV-C; b: Bomba peristáltica; c: Câmara de filtragem.

Fonte: Elaborada pela autora

## 5.1 Módulo de irradiação UV-C

A fonte de irradiação usada é um equipamento desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT)<sup>60,62</sup> do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo. O dispositivo para irradiação dos fluidos é composto por um compartimento metálico, equipado com quatro lâmpadas tubulares de radiação UV-C. Cada uma das lâmpadas tem uma irradiância de  $4,5 \text{ mW/cm}^2$  emitindo no total  $18 \text{ mW/cm}^2$ , com emissão centrada no comprimento de onda de 254 nm, dispostas em um arranjo circular. O circuito circulante é composto por tubos de silicone e uma bomba peristáltica (WP10, Welco, Japão) com capacidade de circulação de fluxo de 200 mL/min. Os tubos conectam a bomba à câmara de filtração que vai conter o material contaminado e ao tubo de quartzo de 12 cm de comprimento e 0,8 cm de diâmetro interno que se encontra posicionado no centro do arranjo das lâmpadas de UV-C.

## 5.2 Câmara de Filtração Unidirecional

Para simular um órgão e algumas das barreiras físicas que podem se encontrar nele quando é perfundido, foi desenvolvido um dispositivo metálico cilíndrico constituído por uma câmara de filtração unidirecional (Figura 7). A câmara foi utilizada para desenvolver vários modelos de contaminação dependendo do material e disposição no seu interior.

Para a primeira configuração utilizada, um filtro de tecido de aço inoxidável no formato de disco, com 10,6 cm de diâmetro e tamanho de poro de  $5 \mu\text{m}$  (BT Metal, Estados Unidos) foi seccionado em três filtros circulares menores, com 3,7 cm de diâmetro, e adaptado em cada segmento da câmara. Estes discos menores foram colocados a 2,5 cm de distância um do outro. Na outra configuração, a câmara foi preenchida com uma esponja vegetal contendo peça de cerâmica (2,0 x 0,5 x 0,5 cm). Os diferentes materiais atuaram como retenção e fonte celular do *S. aureus* nos diferentes modelos desenvolvidos.

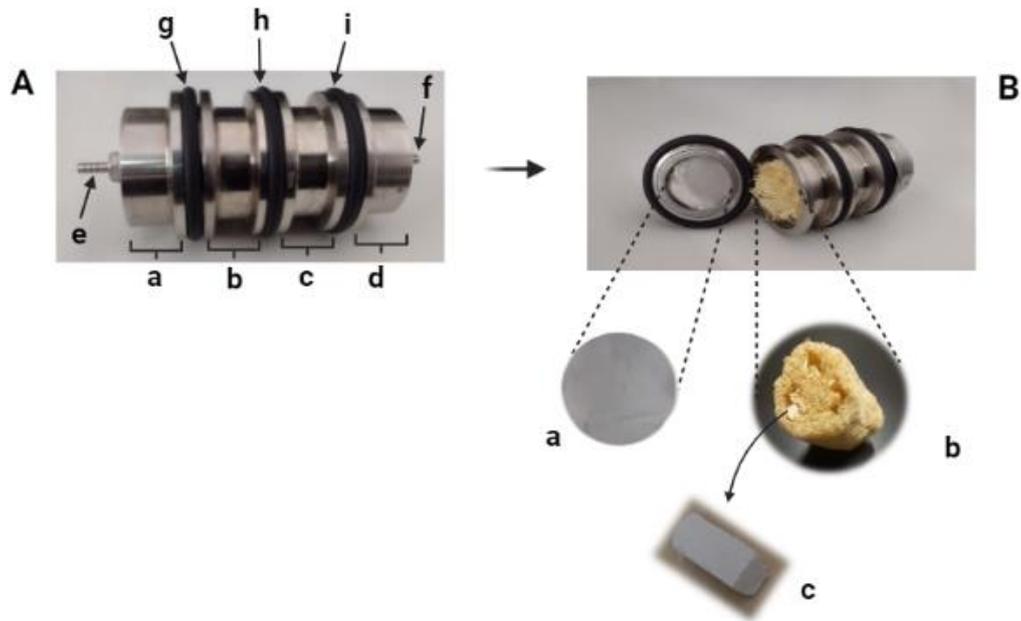


Figura 7 - Imagem ilustrativa da câmara de filtração unidirecional (painel A) e materiais utilizados para fornecer barreiras físicas e retenção bacteriana (painel B). Painel A: partes da câmara de filtração: os elementos *a, b, c, d* são segmentos de aço inoxidável; *e, f* são conectores rápidos para conectar os tubos de silicone; *g, h, i* apontam anéis onde são colocadas membranas e anéis de borracha vulcanizada que unem os segmentos e são ajustados por abraçadeiras. Painel B: câmara de filtração contendo membrana e esponja vegetal com peça cerâmica: *a* indica a membrana; *b* indica a bucha vegetal contendo a peça cerâmica; e *c* indica a peça cerâmica.

Fonte: Elaborada pela autora.

A câmara é feita de aço inoxidável 304, seccionada em três segmentos expansíveis idênticos unidos por uma abraçadeira e um flange tipo KF (padrão para sistemas de baixo vácuo) e adaptada para este uso específico. Os segmentos em cada extremidade (direita e esquerda) possuem orifícios nos quais os conectores são adaptados e conectados à tubulação de silicone. Cada segmento é selado por um anel tipo *O-ring* acoplando cada segmento com uma borracha vulcanizada.

A montagem do dispositivo é feita tal que apenas exista fluxo em um único sentido, sendo que dentro das câmaras ocorre pequeno acúmulo da solução a ser filtrada por segmento. As membranas e outros tipos de materiais, como a esponja vegetal podem ser montadas em distâncias ajustáveis e em diferentes especificações de filtração, uma vez que cada segmento é independente e as membranas não são de fixação permanente. Dessa forma, diferentes condições de filtração podem ser simuladas.

### 5.3 Obtenção do inóculo de *S. aureus* ATCC25293

#### 5.3.1 Obtenção das colônias de *S. aureus* ATCC25293

A cepa de *S. aureus* ATCC25293 foi reativada através da aplicação do método de propagação na placa. Uma alíquota de 10 µL da bactéria previamente congelada foi adicionada em uma placa contendo *Brain-Heart Infusion* (BHI) e espalhada em forma de zigue-zague com ajuda de uma alça de inoculação. A placa foi colocada na estufa DBO (Electrolab<sup>®</sup>, modelo EL 101/3, Brasil) submetida a uma temperatura de 37 °C por 48 horas. Após desse tempo de incubação foram obtidas colônias de *S. aureus* a partir das quais foi obtido o inóculo planctônico e as utilizadas nos testes aonde foram esfregadas nas membranas.

#### 5.3.2 Obtenção do inóculo planctônico de *S. aureus* ATCC25293

Para a obtenção do inóculo com as células planctônicas reativou-se a cepa de *S. aureus* ATCC25293 como descrito na seção 5.3.1. Oito colônias da bactéria foram transferidas para um tubo tipo Falcon contendo 10 mL de Ágar BHI líquido que foi colocado na incubadora tipo *shaker* SL-22 (SOLAB, Brasil) mantido sob agitação a 150 rpm por 18 horas a 37 °C. Passado esse tempo de incubação, preparou-se o inóculo em BHI líquido na proporção 1:10 (volume), levou-se novamente para a incubadora tipo *shaker* SL-22 por mais 4 horas. Posteriormente, foi medida a absorbância da suspensão no espectrofotômetro Cary 50 (Varian, Estados Unidos) no comprimento de onda em 600 nm e uma alíquota de 400 µL da solução foi plaqueada em triplicata em cinco diluições. Na sequência, o tubo Falcon contendo o inóculo foi colocado na centrífuga a 3.000 rpm por 10 minutos, para a separação das bactérias do BHI. O líquido sobrenadante foi descartado e adicionado PBS no mesmo volume de BHI (sobrenadante), sendo repetida a centrifugação duas vezes. O granulado de célula final foi suspenso em PBS a uma densidade óptica de 0,3 correspondente a 6 log UFC/mL, verificada a 600 nm no espectrômetro.

## 5.4 Contaminação das membranas e da peça de cerâmica

### 5.4.1 Contaminação das membranas

As membranas foram contaminadas de duas formas, uma delas foi com células planctônicas de *S. aureus* e a outra com as colônias da bactéria.

#### *Membranas contaminadas com bactérias planctônicas (MP)*

Após o inóculo planctônico bacteriano estar pronto para uso (previamente preparado como descrito na seção 5.3.2, três membranas de 3,7 cm de diâmetro foram contaminadas adicionando 0,2 mL do inóculo na concentração de 6 log UFC/mL em cada uma delas e inseridas na câmara de filtração.

#### *Membranas contaminadas com colônias da bactéria (MC)*

Ao serem obtidas as colônias da bactéria *S. aureus* como descrito na seção 5.3.1, cinco colônias foram coletadas com uma alça de inoculação e esfregadas em cada uma das três membranas utilizadas no teste. Feita a contaminação, as membranas foram introduzidas na câmara de filtração para o posterior desenvolvimento do teste.

### 5.4.2 Contaminação das peças de cerâmica

As peças de cerâmica utilizadas foram contaminadas mergulhando-as por 30 min no PBS que continha o *pellet* celular na concentração 6 log UFC/mL obtido como descrito na seção 5.3.2. Após esse tempo, as peças de cerâmica foram inseridas dentro da esponja vegetal e o conjunto foi colocado dentro da câmara de filtração para o desenvolvimento do teste.

## 5.5 Metodologia estabelecida nos testes de inativação bacteriana *in vitro*

Os testes de inativação bacteriana *in vitro* foram desenvolvidos utilizando o mesmo procedimento de irradiação associado à perfusão e o mesmo método de análise microbiana, as modificações na metodologia foram o material contaminado no interior da câmara de filtração, a técnica de contaminação deles, o líquido circulante ou a fonte de irradiação dependendo do teste a ser executado.

### 5.5.1 Teste de inativação usando câmara de filtração com membranas e peça de cerâmica contaminadas com *S. aureus*

As membranas e peças de cerâmica foram contaminadas como descrito nas seções 5.4.1 e 5.4.2 (dependendo do teste) e posicionadas na câmara de filtração como se mostra no painel B da Figura 7. Um volume de 100 mL de PBS foi circulado no sistema (Figura 8) a baixa temperatura (15-17 °C) por 5 min com o intuito de homogeneizar a solução. O experimento foi realizado em duas partes: sem irradiação (grupo de controle) e com as lâmpadas UV-C ligadas (grupo irradiado), com um tempo total de perfusão de 4 horas para ambos os grupos. Com o sistema circulando, amostras de 3 mL do perfusato foram coletadas aos tempos 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 180 e 240 minutos. Após a coleta de cada amostra, foi feita uma diluição seriada  $10^{-5}$ , e na sequência foi feito o plaqueamento em triplicata, espalhando as diluições em placas de Petri com meio BHI ágar as quais foram incubadas durante 24 horas a 37 °C. Após desse tempo foi realizada a quantificação das UFC/mL, resultado que foi processado e graficado. Os experimentos foram repetidos em três ocasiões.

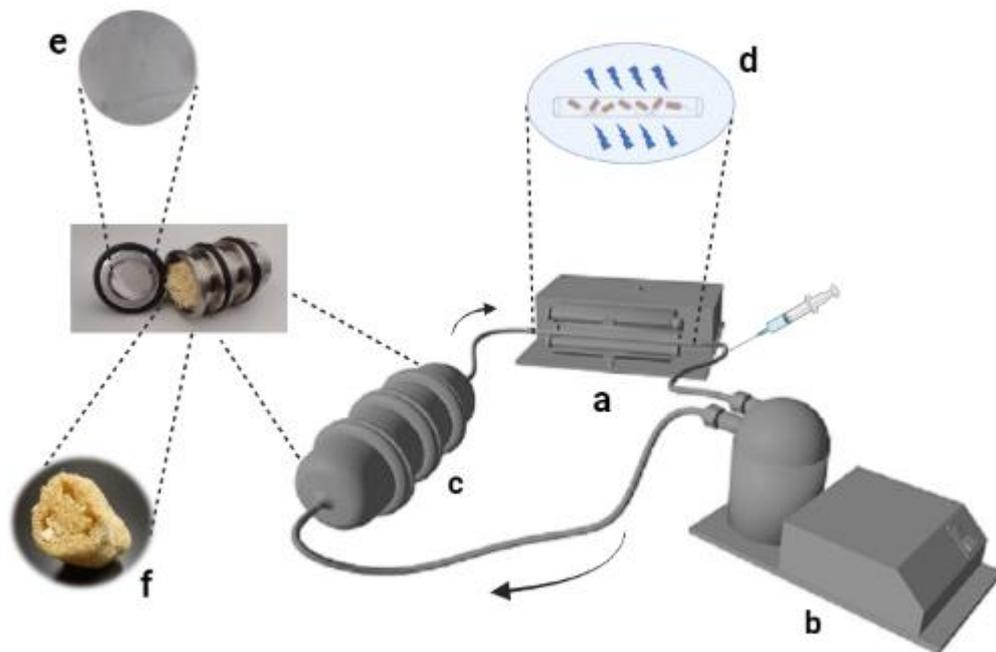


Figura 8 - Esquema descritivo do processo de inativação bacteriana com radiação ultravioleta-C simulando a perfusão no modelo experimental utilizado: a: Fonte de irradiação de luz UV-C; b: Bomba peristáltica WP10; c: Câmara de filtração; d: tubo de quartzo onde é irradiado o líquido circulante contaminado; e: membrana com poros de 5µm; f: esponja vegetal com os fragmentos de cerâmica. O sistema contém tubos de silicone que conectam cada um dos componentes permitindo a circulação do líquido bombeado pela bomba peristáltica mantendo um fluxo contínuo de 200 mL/min.

Fonte: Elaborada pela autora

### 5.5.2 Remanescente bacteriano após do processo de tratamento

Com o intuito de saber a remanescente de bactérias nas membranas após a perfusão com ou sem irradiação, as três membranas contaminadas foram removidas da câmara de filtração e inseridas cada uma em um béquer contendo 3 mL de PBS. Os béqueres foram colocados em banho ultrassônico (Maxsonic D-40XAE, CTA do Brasil) por 20 minutos a temperatura de 25 °C e frequência de 50 kHz.<sup>61</sup> Posteriormente, foram coletadas amostras da solução e foi feita a diluição seriada  $10^{-5}$  e posterior plaqueamento em triplicata em placas de Petri contendo o BHI ágar. Após as 24 horas de incubação, foi feita a contagem das UFC/mL, resultado que foi processado gerando gráficos para melhor entendimento do comportamento do crescimento bacteriano.

As membranas foram removidas do banho ultrassônico e nova coleta realizada na superfície de cada uma das membranas com *swab* que, na sequência, foi mergulhado em 400 µL

de BHI líquido, e posteriormente em diluição seriada  $10^{-5}$ , plaqueada e incubada durante 24 horas como descrito anteriormente para posterior quantificação das UFC/mL.

## 6 Descontaminação no modelo das membranas metálicas

### 6.1 Resultados e discussão

As figuras representadas a seguir mostram as médias do crescimento bacteriano em unidades formadoras de colônias (UFC) obtido nos diferentes tempos nos quais foram feitas as coletas durante 4 horas de duração de cada um dos experimentos realizados, com e sem irradiação em função da dose de entregue. Os valores da fluência para o volume total do líquido ( $\text{J}/\text{cm}^3$ ) assim como a fluência superficial ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ) para cada tempo nos que foram feitas a coletas das amostras foram calculados como explicado no anexo. A tabela 1 mostra os resultados obtidos para cada vez.

Tabela 1 - Valor da fluência fornecida calculada para cada tempo de irradiação no qual as amostras foram coletadas.

Tempo (minutos)	Tempo (segundos)	$D_v$ ( $\text{J}/\text{cm}^3$ )	$D_s$ ( $\text{J}/\text{cm}^2$ )
0	0	0	0
20	1200	1.13	21.6
40	2400	2.27	43.2
60	3600	3.40	64.8
80	4800	4.53	86.4
100	6000	5.67	108
120	7200	6.81	129.6
180	10800	10.21	194.4
240	14400	13.62	259.2

Fonte: Elaborada pela autora

Para avaliar a eficácia da radiação UV-C (254 nm) na inativação de *S. aureus* planctônica no teste *in vitro* simulando a perfusão *ex vivo* do órgão com PBS, testes em grupos controle e irradiados foram realizados.

A resposta de inativação bacteriana foi monitorada em função do tempo ou fluência entregue até 4 horas sem (controle) e com irradiação UV-C, como se mostra na Figura 9. Os eixos indicam crescimento bacteriano em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e a fluência em  $\text{J}/\text{cm}^2$ , mas vale ressaltar que as amostras do grupo controle não receberam dose de luz. As amostras do grupo controle são as que aparecem com quadrados

pretos e as amostras do grupo irradiado com círculos vermelhos. Os resultados obtidos evidenciam a redução total dos microrganismos que se encontram no meio.

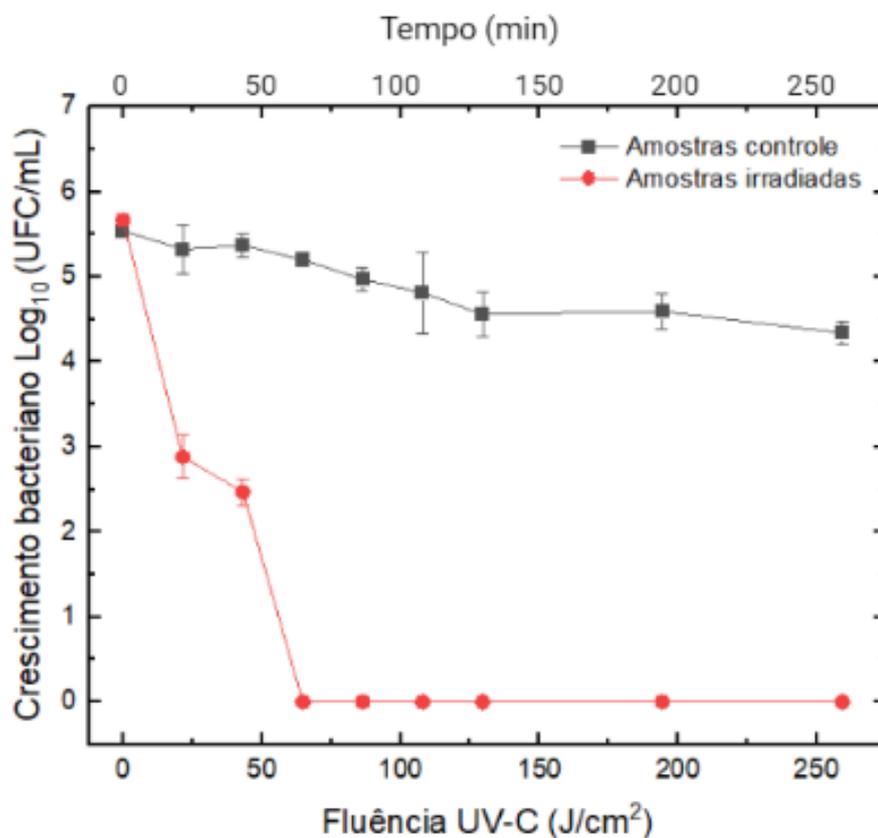


Figura 9 - Efeito da irradiação ultravioleta UV-C (254 nm) na inativação bacteriana em PBS por 240 min usando a câmara de filtragem contendo membranas contaminadas com *S. aureus* planctônicas. Os eixos indicam crescimento bacteriano em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e a fluência (UV-C) em J/cm<sup>2</sup>. As amostras do grupo controle são mostradas com quadrados pretos e as amostras do grupo irradiado com círculos vermelhos.

Fonte: Elaborada pela autora

Uma alta taxa de inativação é observada no grupo irradiação, com redução de 5 log<sub>10</sub> UFC/mL, correspondendo a uma inativação total das bactérias circulantes no PBS após 60 min de irradiação com uma fluência de 64,8 J/cm<sup>2</sup>. Por outro lado, no grupo controle não irradiado, apenas 1 log<sub>10</sub> (UFC/mL) foi reduzido.

De acordo com o gráfico da Figura 9, no grupo de controle, observa-se uma redução de 1 log<sub>10</sub> UFC/mL, taxa de inativação bacteriana esperada já que as bactérias foram mantidas circulando em PBS, a baixa temperatura e sem a adição de nutrientes relevantes para a manutenção de seu metabolismo. Entretanto, quando a irradiação ultravioleta C é adicionada

ao sistema de perfusão, a inativação das bactérias em circulação se mostra muito eficaz, sendo que, após 60 min de irradiação com uma fluência de 64,8 J/cm<sup>2</sup> conseguiu-se a inativando 5 log<sub>10</sub> UFC/mL representando a totalidade das bactérias que se encontravam no meio. Comparando os resultados obtidos nos dois grupos, foi observada uma diminuição das bactérias remanescentes nas membranas do grupo irradiado, que podem estar diretamente associadas à ação da irradiação UV-C, uma vez que diminuindo a carga bacteriana circulante, uma menor quantidade de células podem se aderir às membranas.

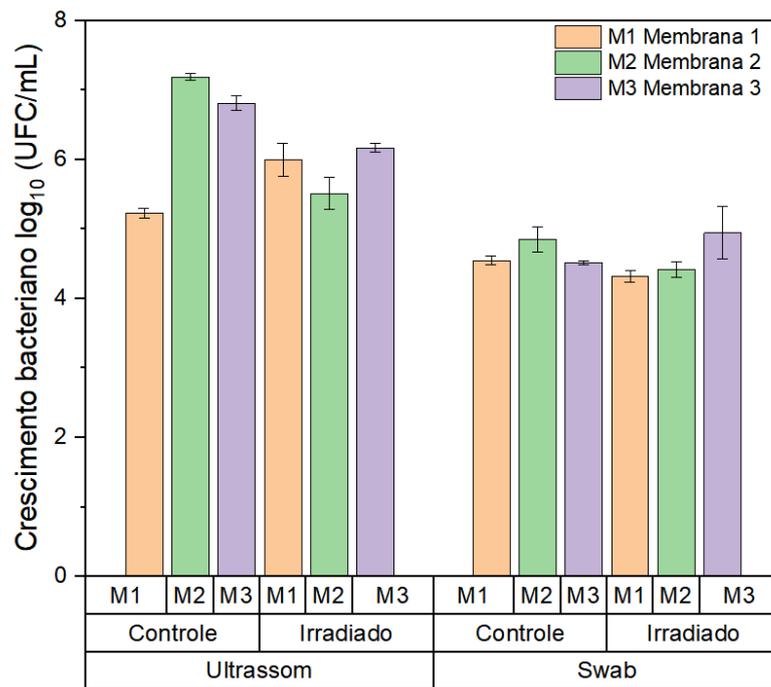


Figura 10 - Contaminação remanescente de *S. aureus* em membranas após banho ultrassônico e coleta de *swab* nos testes controle e irradiado no modelo aonde as membranas foram contaminadas com bactérias planctônicas. As barras laranja, verde e roxa representam as membranas um (M1), dois (M2) e três (M3), respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora

O gráfico representado na Figura 10 mostra a contaminação bacteriana nas membranas após o banho ultrassônico e a coleta por *swab* feito nas membranas nos testes controle e irradiado. A contaminação bacteriana residual esteve presente nas membranas para ambos os métodos de amostragem.

Os resultados obtidos estão de acordo com os trabalhos reportados na literatura, onde a irradiação UV-C associada à perfusão promove a inativação de células circulantes (bactérias)<sup>62</sup> ou vírus.<sup>60</sup> O método apresenta alta eficiência na descontaminação do fluido circulante,

independentemente do tipo de microrganismo. Mais especificamente para a *S. aureus*, a entrega de fluência que usualmente são relatadas na literatura para inativação por UV-C é de 43,2 J/cm<sup>2</sup>.<sup>62</sup> Aqui vale ressaltar que esses parâmetros não podem ser diretamente comparados ao do protocolo do presente estudo, uma vez que a fluência calculada é a dose de energia entregue durante todo o tempo de perfusão, sendo que a solução não está estática, assim a irradiação para as células circulantes é bem inferior a esse valor.

Para investigar as consequências da inativação bacteriana no modelo de perfusão quando o microrganismo está formando colônias, a contaminação das membranas foi realizada esfregando cinco colônias de *S. aureus* cultivadas por membrana. A Figura 11 mostra o comportamento do crescimento bacteriano log<sub>10</sub> (UFC/mL) no grupo controle e irradiado em função da fluência (J/cm<sup>2</sup>).

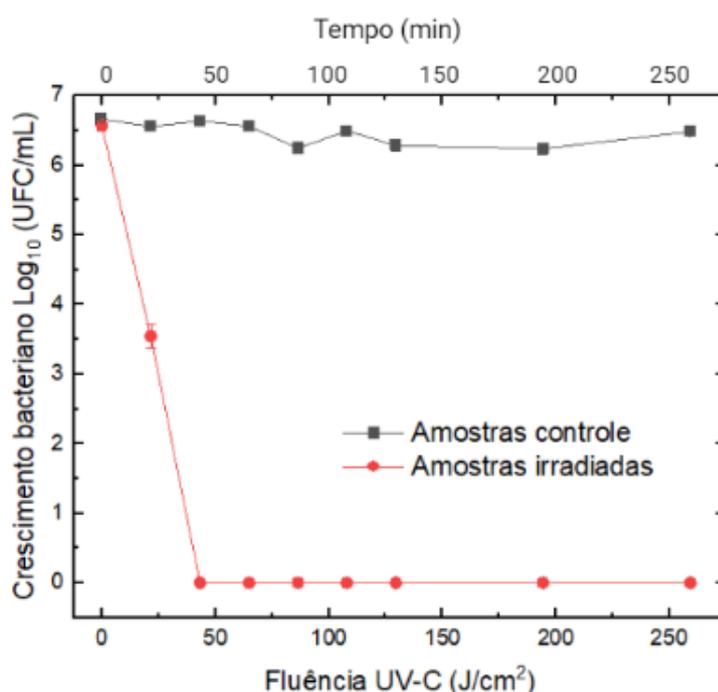


Figura 11 - Efeito da radiação ultravioleta UV-C (254 nm) na inativação bacteriana em PBS usando uma câmara de filtro contendo membranas contaminadas com colônias de *S. aureus*. Os eixos indicam o crescimento bacteriano em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e a fluência em J/cm<sup>2</sup>. As amostras do grupo controle são mostradas com quadrados pretos e as amostras do grupo irradiadas com círculos vermelhos.

Fonte: Elaborada pela autora

As bactérias residuais presentes no meio após o banho ultrassônico e coletadas pelo *swab* de cada membrana ao final das 4 horas de perfusão no grupo controle e irradiado são apresentadas na Figura 12.

As amostras coletadas do grupo controle após o ultrassom apresentam uma recuperação de 3 a 5 log (UFC/mL) de *S. aureus*. A coleta do *swab* diretamente das membranas, no entanto, resultou em 4 a 6 log (UFC/mL) de bactérias remanescentes.

Ao comparar os grupos controle e irradiado, a contaminação residual nas membranas sob a perfusão irradiada foi reduzida, exceto para a membrana 2 da amostragem do *swab*. Adicionalmente, o remanescente bacteriano na membrana 3 apresentou os maiores valores, uma vez que seguindo a direção do fluxo da solução é a membrana que acaba retendo uma maior quantidade de bactérias.

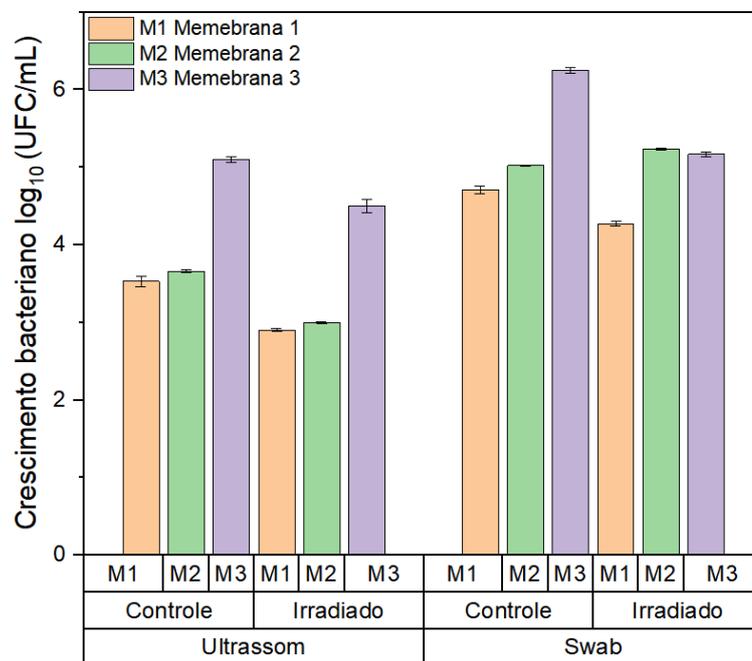


Figura 12 - Carga bacteriana remanescente de *S. aureus* em membranas após banho ultrassônico e coleta de swab nos testes controle e irradiado no modelo aonde as membranas foram contaminadas com esfregaços de colônias da bactéria. As barras laranja, verde e roxa representam as membranas um (M1), dois (M2) e três (M3), respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora

Com o desenvolvimento desse modelo *in vitro*, com a utilização de uma câmara de filtragem de sentido único contendo três membranas metálicas contaminadas com *S. aureus* planctônicas e formando biofilme simulando barreiras físicas para a retenção das bactérias foi demonstrada a limitação da técnica por não ação direta no foco de infecção. A irradiação UV-C associada à perfusão promove a inativação das bactérias circulantes, resultando em uma pequena diminuição da carga bacteriana nas membranas, mas sem resultados efetivos na descontaminação do foco de infecção.

Tendo em conta os resultados expostos no gráfico da Figura 11 não foi observada redução bacteriana no grupo controle, durante todo o tempo experimental sendo que o nível de contaminação do meio bacteriano foi mantido em  $6 \log_{10}$  (UFC/mL). No grupo irradiado obteve-se uma inativação total de  $6 \log_{10}$  (UFC/mL) após 40 min de irradiação com uma fluência de  $43,2 \text{ J/cm}^2$ . Apresentando o mesmo comportamento do experimento anterior com as células planctônicas, conseguindo a inativação da totalidade das bactérias circulantes no meio, resultado diretamente associado à ação da irradiação UV-C. O remanescente de alta carga bacteriana nas membranas é um problema a resolver.

Quando comparado com diferentes estudos realizados nos quais o UV-C foi utilizado para inativação microbiológica através de líquidos circulantes,<sup>144-147</sup> houve um estudo no qual a radiação UV-C foi aplicada para esterilizar Dextrose 5% e 0,9% de solução salina armazenada a baixas temperaturas, conseguindo 100% de eliminação da carga bacteriana através da aplicação de uma fluência de  $3,4 \text{ J/cm}^2$  durante 30 min.<sup>148</sup> Em um estudo recente, em modelo porcino, descrevendo a eficácia dos UV-C como agente físico para descontaminação dos rins durante a fase de perfusão dos órgãos, eles foram capazes de eliminar uma carga bacteriana de 5 log de bactérias encontradas em PBS em 40 min, e durante os testes de descontaminação HTK em circulação, com uma fluência de  $13,5 \text{ J/cm}^2$  e 12,5 min de irradiação eles conseguiram uma redução de 99,99% da carga bacteriana circulante.<sup>62</sup> Há um estudo que demonstrou a eficácia do uso da irradiação UV-C quando o fluido é irradiado durante a perfusão pulmonar *ex vivo* (EVLP), conseguindo a inativação do vírus da hepatite C e a redução da carga viral nos pulmões doadores com uma irradiação de  $31 \text{ mW/cm}^2$ .<sup>60-61</sup>

Um parâmetro muito importante a ser considerado na descontaminação do órgão para transplante é o tempo de descontaminação, pois a desinfecção do órgão deve ocorrer dentro do tempo permitido para que o órgão permaneça na máquina de perfusão. O fato de conseguir a descontaminação de 100% da carga microbiana do líquido circulante no tempo máximo de 60 minutos demonstra a eficácia e eficiência do uso da radiação UV-C em conjunto com o sistema de perfusão do órgão.

Quando são analisados os resultados que mostram os gráficos das Figuras 11 e 13 pode se constatar que uma alta carga bacteriana permanece nas membranas, apesar de que todas as bactérias que estavam no meio circulante terem sido inativadas. Quando comparamos o valor médio obtido dos grupos controle e irradiado das membranas 1, 2 e 3, constatamos que, apesar de ter conseguido desprender  $6 \log_{10}$  UFC/mL das membranas, quando foi feito o *swab*, as membranas ainda continham  $4 \log_{10}$  UFC/mL de *S. aureus* aderidas. Tal resultado representa as

complicações enfrentadas na descontaminação de órgãos. Enquanto o *S. aureus* planctônico é liberado da solução circulante, aqueles que aderem a um substrato mostram uma retenção muito maior, o que pode ser uma evidência de quão difícil o processo pode ser para os órgãos. Mesmo assim, uma diminuição média de  $2 \log_{10}$  UFC/mL não é desprezível sob essas circunstâncias. Esses resultados mostram a relevância de desenvolver métodos de desprendimento bacteriano ou tratamento antimicrobiano *in situ* para melhorar a descontaminação de órgãos em combinação com o tratamento UV-C do perfusato.

Para esta aplicação, o órgão contaminado pode ser considerado como um foco ativo de infecção e que o fluxo de perfusão promoverá o desprendimento bacteriano em diferentes taxas, dependendo das características de aderência do microrganismo e das barreiras mecânicas atuais para o fluxo de entrada. Neste cenário, a avaliação da eficácia da inativação UV-C associada ao procedimento de perfusão em diferentes modelos *in vitro* é essencial antes de planejar qualquer estratégia potencial para aumentar a capacidade de remover microrganismos através da perfusão *ex vivo* e validar em modelos animais e pré-clínicos.

A dinâmica do fluxo, bem como a distribuição das bactérias que circulam no líquido pode variar em cada experimento, resultando em maior ou menor homogeneidade da difusão das bactérias. Outros fatores variáveis durante o processo e não controlados são a aderência das bactérias a alguns materiais, bem como a retenção em alguns compartimentos do sistema de perfusão.

O resultado mais significativo deste estudo *in vitro* é que foi possível demonstrar a capacidade do módulo de irradiação UV-C para descontaminar o fluido circulante quando ele é acoplado ao sistema de perfusão *ex vivo*, mas existe a necessidade de estratégias para o tratamento do foco da infecção ou de desprendimento bacteriano dos tecidos biológicos.

## 6.2 Conclusões Parciais

O estudo *in vitro* mostra a possibilidade de usar a radiação ultravioleta C (254 nm) como alternativa para descontaminação de soluções circulantes durante a perfusão *ex vivo* de enxertos contaminados com *S. aureus*.

Foi possível obter a inativação total das bactérias que permaneceram no líquido, mostrando uma redução total de  $6 \log_{10}$  UFC/mL em até uma hora de irradiação.

O fato de que as bactérias permaneceram nas membranas, após o processo de inativação levantou a questão sobre o que pode acontecer no órgão no momento da remoção dos

microrganismos que estão aderidos aos tecidos e membranas que podem atuar como barreiras que limitando a remoção apenas pelo fluxo da perfusão. Encontrar maneiras de permitir tal remoção a fim de aumentar a efetividade da liberação bacteriana e assim promover uma maior redução é um desafio a ser superado. No entanto, a redução de 2 log (UFC/mL) é uma evidência de melhor resposta no tratamento do órgão associado à perfusão *ex vivo*.

## 7 Descontaminação no modelo da câmara de filtragem com esponja vegetal contendo peça de cerâmica contaminada com *S. aureus*

### 7.1 Resultados e discussão

Os resultados da inativação bacteriana obtidos usando o modelo de esponja vegetal/cerâmica mostram-se na Figura 13, expondo o comportamento do crescimento bacteriano  $\log_{10}$  (UFC/mL) no grupo controle e irradiado em função da fluência ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Mais uma vez, houve uma inativação total das bactérias que se encontravam no meio  $6 \log_{10}$  (UFC/mL) após 40 min de irradiação com uma fluência de  $43,2 \text{ J}/\text{cm}^2$  e não se obteve nenhuma redução no grupo controle.

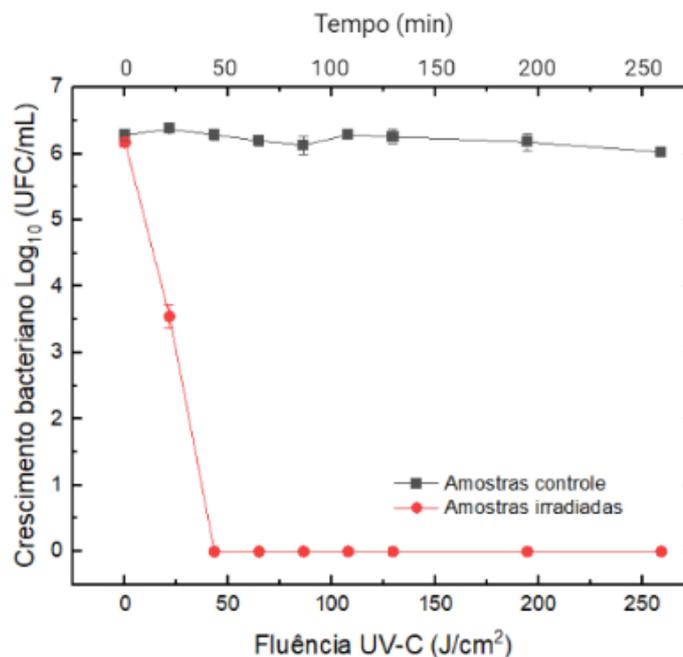


Figura 13 - Efeito da radiação ultravioleta UV-C (254 nm) na inativação bacteriana por 240 min utilizando a câmara de filtro contendo esponja vegetal com peças cerâmicas contaminadas com *S. aureus*. Os eixos indicam o crescimento bacteriano  $\log_{10}$  em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e a fluência em  $\text{J}/\text{cm}^2$ . As amostras de controle são mostradas com quadrados pretos e as amostras irradiadas com círculos vermelhos.

Fonte: Elaborada pela autora.

A contaminação residual após o banho ultrassônico no meio, na esponja vegetal e nas peças cerâmicas com amostragem de *swab* é apresentada na Figura 14, demonstrando a carga bacteriana residual tanto na esponja como na cerâmica dos grupos controle e irradiado.

Nesse modelo *in vitro* aonde foi utilizada a câmara de filtragem de sentido único contendo a esponja vegetal com as peças de cerâmica contaminadas com *S. aureus* investigamos

outra superfície de adesão e barreiras físicas modificando o fluxo da solução em no ambiente do foco da infecção.

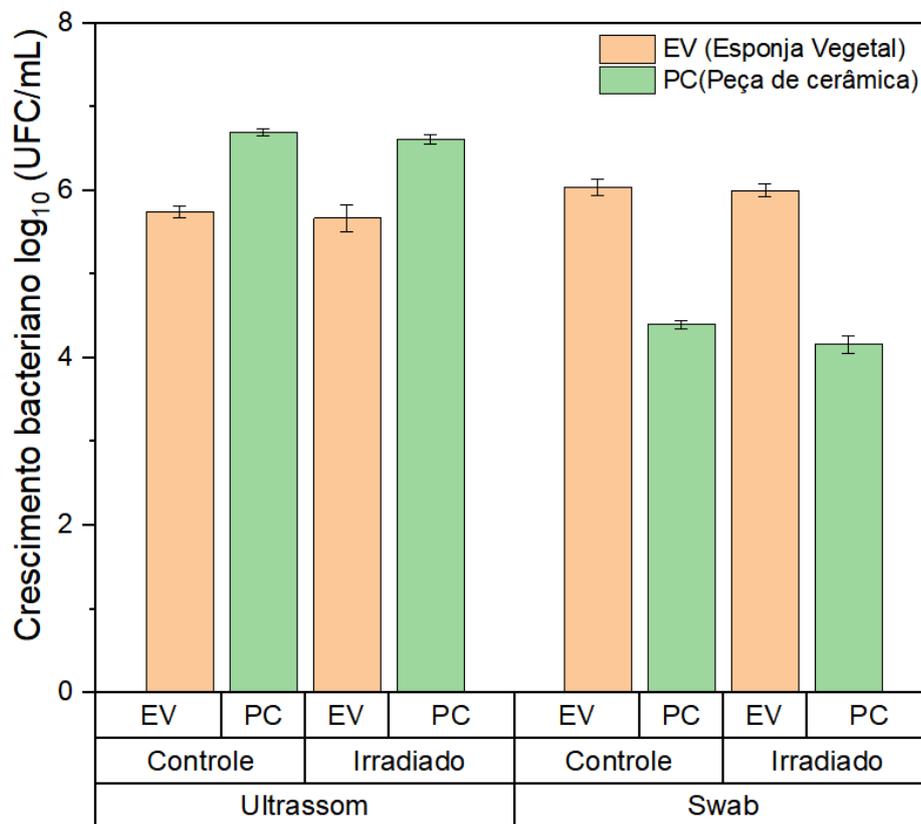


Figura 14 - Contaminação residual por *S. aureus* na esponja vegetal e sonicação de peças cerâmicas e coleta de *swab* nos testes controle e irradiado. As barras laranja e verde representam a esponja vegetal e as peças de cerâmica, respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora

Tendo em conta os resultados expostos no gráfico da Figura 13, no grupo controle não se observa redução da taxa bacteriana durante as 4 horas do desenvolvimento do teste, mantendo a carga bacteriana do meio em  $6 \log_{10}$  (UFC/mL). Por outro lado, quando comparamos com o grupo irradiado, observa-se uma inativação de  $6 \log_{10}$  (UFC/mL) após do 40 min de irradiação com uma fluência de  $43,2 \text{ J/cm}^2$ , o que representa a totalidade dos microrganismos que se encontravam no meio.

Ao analisar os resultados do gráfico mostrado na Figura 14 constatou-se que tanto para o grupo controle quanto para o grupo irradiado, foi observada uma recuperação de 4 a  $6 \log$  (UFC/mL) de *S. aureus*, resultados que demonstram uma maior carga bacteriana remanescente nos substratos materiais, em comparação com a membrana metálica. O fluxo utilizado não é capaz de desgrudar a totalidade das bactérias que retidas na esponja e nas peças de cerâmica,

no entanto, o fluxo não é um fator que se pode alterar no processo, pois o regime de valores já está definido para a segurança dos órgãos.

## 7.2 Conclusões Parciais

O estudo *in vitro* mostra a possibilidade de usar a radiação ultravioleta C (254 nm) como alternativa para descontaminação de soluções circulantes durante a perfusão *ex vivo* de enxertos contaminados com *S. aureus*. Os resultados de inativação das bactérias circulantes foram semelhantes aos obtidos com o modelo das membranas. Foi possível a inativação da totalidade das bactérias que se encontravam no líquido, mostrando uma redução total de 6 log<sub>10</sub> UFC/mL em até 40 min de iluminação com uma fluência de 43.2 J/cm<sup>2</sup>.

A carga bacteriana residual no modelo da esponja e das peças de cerâmica foi superior ao observado nas membranas metálicas. Novamente, o fluxo empregado na perfusão *ex vivo* de órgãos sólidos não promoveu uma remoção eficiente das bactérias adicionadas nas peças cerâmicas, nem das células que contaminaram a esponja durante o processo.



## **8 Combinação da Radiação Ultravioleta C e Oxacilina Sódica 500 mg associado a perfusão usando uma câmara de filtração contendo membranas contaminadas com esfregaços de colônias de *S. aureus***

De acordo com os resultados obtidos nos capítulos anteriores a remoção da totalidade das bactérias aderidas nos diversos materiais utilizados é uma limitante para aumentar a efetividade da redução microbiana no órgão. Encontrar alternativas que permitam tal remoção a fim de aumentar a efetividade da liberação bacteriana e assim promover uma maior redução é um desafio a ser superado. Por tal motivo, nesse capítulo exploramos a combinação da Radiação Ultravioleta C e Oxacilina Sódica 500 mg. A ideia de associar o antibiótico foi de avaliar um possível efeito de morte celular das bactérias aderidas nas membranas e/ou de aumentar o desprendimento das células. Para isso foram desenvolvidos vários testes utilizando o mesmo modelo de descontaminação *in vitro* associado à perfusão como descrito no capítulo 6.

### **8.1 Objetivos específicos**

- Avaliar a efetividade da combinação da Radiação Ultravioleta C e Oxacilina Sódica 500 mg na descontaminação do modelo empregando a câmara de filtração contendo membranas contaminadas com esfregaços de colônias de *S. aureus*.

### **8.2 Materiais e Métodos**

Para o desenvolvimento do experimento as membranas foram contaminadas com colônias de *S. aureus* que foram obtidas como descrito nas seções 5.3.1, seguindo o protocolo de contaminação descrito na seção 5.4.1 (MC), as quais foram inseridas na câmara de filtração, como se mostra na Figura-8. Os testes de inativação assim como a quantificação da carga bacteriana residual nas membranas depois do processo de inativação foram desenvolvidos seguindo o descrito na seção 5.5.1 e 5.5.2 respectivamente. A diferença radica na adição de Oxacilina Sódica 500 mg no PBS (líquido circulante).

### 8.2.1 Oxacilina Sódica 500 mg pó injetável

A Oxacilina Sódica é uma penicilina semissintética, pertencente à família das isoxasolilpenicilinas, altamente resistente à degradação por penicilinases e, portanto, útil no tratamento de infecções causadas por estafilococos produtores dessas enzimas.<sup>147</sup>

Seu mecanismo de ação é baseado na inibição da síntese de peptidoglicanos da parede bacteriana. Esta inibição depende da capacidade da penicilina de alcançar e se ligar às proteínas de ligação à penicilina (PBPs), localizadas na membrana interna da parede bacteriana. As PBPs que incluem as transpeptidases, carboxilases e endopeptidases são enzimas que estão envolvidas nos estágios finais da montagem da parede bacteriana e na remodelação da parede bacteriana durante o crescimento e a divisão. As penicilinas ligam e inativam PBPs resultando no enfraquecimento e lise da parede bacteriana.<sup>147-148</sup>

Após a administração intramuscular ou intravenosa, concentrações adequadas de plasma são alcançadas em aproximadamente 1 hora. O tempo de vida meia do fármaco varia de 30 a 60 min. A ligação à albumina de plasma é significativa a 90-95%. Possui metabolismo hepático e rápida eliminação por via renal e também uma eliminação hepática significativa através da biliar.<sup>147</sup>

A Oxacilina Sódica é um pó injetável de uso hospitalar que foi fabricado pela empresa farmacêutica Blau Farmacêutica S.A. A diluição do pó foi feita misturando 625 mg do antibiótico em 100 mL de PBS.

### 8.2.2 Teste de estabilidade do poder bactericida da Oxacilina Sódica 500 mg após da irradiação com UVC durante 4 horas

Para avaliar a estabilidade do poder bactericida da Oxacilina Sódica 500 mg, um volume de 40 mL de PBS e Oxacilina sódica 6,25mg/L foi circulado no sistema durante 4 horas e irradiado com luz UV-C. Com o sistema em circulação foram feitas coletas de 100 µL do perfusato nos tempos: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 180 e 240 min e adicionadas nos tubos tipo Eppendorf contendo 75 µL de BHI e 25 µL de *S. aureus* obtidas previamente como descrito na seção 5.3.2 e colocadas na incubadora a 37 °C por 24 h. Passado o tempo de incubação, foi feita uma diluição seriada 10<sup>-5</sup>, e na sequência foi feito o plaqueamento em triplicata, espalhando as diluições em placas de Petri com meio BHI ágar as quais foram incubadas durante 24 horas a

37 °C. Após de esse tempo foi realizada a quantificação das UFC/mL, resultado que foi processado e graficado.

### 8.2.3 Concentração mínima inibitória (MIC)

A concentração mínima inibitória é definida como a menor concentração de uma agente microbiano capaz de inibir o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo.<sup>149</sup>

Para determinar o MIC foi necessário preparar um estoque do inóculo de *S. aureus* 10<sup>6</sup> log e a solução de Oxacilina Sódica 500 mg ao dobro da concentração a ser testada, que nesse caso a solução de Oxacilina inicial teria uma concentração de 100 mg/L, sendo que, nesse experimento serão testadas soluções com as seguintes concentrações: 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125, 0.390625, 0.1953125 e 0.09765625 mg/L. O inóculo de *S. aureus* foi obtido seguindo o protocolo já descrito na seção 5.3.2. O ajuste da concentração do microrganismo para o D.O em 600 nm fique em 0,3 para obter um inóculo de 10<sup>6</sup> log. O estoque do antibiótico foi preparado pesando 100 mg de Oxacilina Sódica 500 mg e diluídos em 0.001L de água para injeção.

O MIC da Oxacilina Sódica 500 mg foi determinado pelo método de microdiluição usando uma placa para cultivo de células de 96 poços, aplicando o método de diluição seriada para compor todas as concentrações a serem analisadas (Figura 15).

O teste foi feito em triplicata: nos poços (A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub> e C<sub>1</sub>) foram adicionados 100 µL do estoque do antibiótico ao dobro da primeira concentração a ser testada, o processo de diluição seriada foi feito desde a coluna 2 até a 10 das fileiras A, B e C contendo 50 µL do meio Mueller Hinton. Os poços (A<sub>11</sub>, B<sub>11</sub> e C<sub>11</sub>) ficaram vazios, embora nos poços (A<sub>12</sub>, B<sub>12</sub> e C<sub>12</sub>) estará o controle positivo (50 µL meio + 50 µL bactéria) e nos poços (F<sub>12</sub>, G<sub>12</sub> e H<sub>12</sub>) o controle negativo (100 µL meio).

Dos primeiros poços (A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub> e C<sub>1</sub>) serão retirados 50 µL e transferidos para o segundo poço (A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub> e C<sub>2</sub>) e do segundo poço para o terceiro e assim sucessivamente até chegar aos poços (A<sub>10</sub>, B<sub>10</sub> e C<sub>10</sub>) de maneira que cada poço fique com um volume final de 50 µL, sendo que, desses últimos poços devem ser descartados os 50 µL restantes na ponteira. Finalmente, foram adicionados 10µL do estoque da bactéria *S. aureus* e 40µL do meio Mueller Hinton nos poços das colunas 1 até a 10 das fileiras A, B e C. A placa foi selada com um adesivo transparente e colocada na estufa para incubar a 37°C por 24 horas. Passado esse tempo foi

retirado o lacre da placa multipoços e adicionaram-se 30  $\mu$ L do marcador resazurina tornando roxa a solução reservada em cada um dos poços. A placa foi selada novamente e colocada a incubar por mais 4 horas na estufa. Após desse tempo a placa foi retirada da estufa para ser analisada: observou-se a mudança de cor de roxo para rosa a partir dos poços das colunas 5 até a 10 das fileiras A, B e C além do controle positivo, indicativo de crescimento bacteriano. O MIC da Oxacilina Sódica 500 mg seria a solução que fica no poço mais próximo ao primer poço que mostrou crescimento bacteriano.

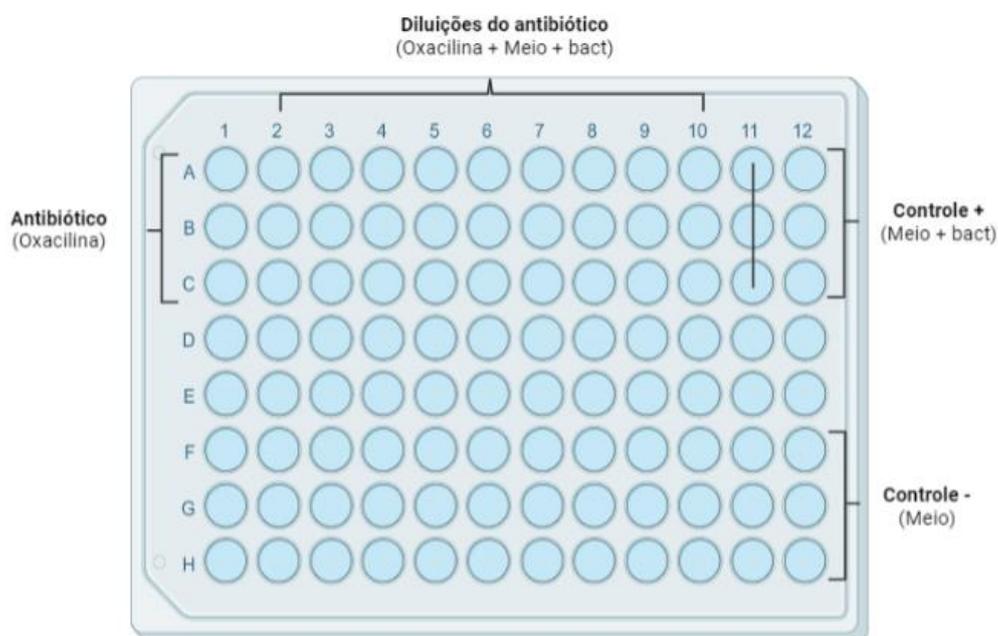


Figura 15 - Esquema descritivo da placa para cultivo de células de 96 poços utilizada na diluição da Oxacilina Sódica 500mg para determinar sua concentração mínima inibitória.

Fonte: Elaborada pela autora

#### 8.2.4 Teste de inativação combinando da radiação ultravioleta C com Oxacilina Sódica 500 mg 6,25 mg/L.

As membranas contaminadas como descrito na seção 5.4.1 (MC) foram posicionadas na câmara de filtragem. Um volume de 100 mL de PBS foi circulado no sistema submetido a baixa temperatura (15-17 °C). O experimento foi realizado em duas partes com um tempo de perfusão total de 4 horas cada um: sem irradiação, circulando PBS e Oxacilina 6,25 mg/L (grupo controle) e com as luzes UV-C acesas (grupo irradiado). No caso do teste de inativação, o PBS circulante foi irradiado durante 1 hora, depois foi desligada a luz e adicionou-se a Oxacilina

Sódica 6,25 mg/L mantendo a circulação do perfusato por mais 3 horas sem irradiar. Com o sistema em circulação foram feitas coletas do perfusato nos tempos: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 180 e 240 minutos. Após de cada coleta foi feita uma diluição seriada  $10^{-5}$ , e na sequencia foi feito o plaqueamento em triplicata, espalhando as diluições em placas de Petri com meio BHI ágar as quais foram incubadas durante 24 horas a 37 °C para posterior quantificação do número de bactérias. Para avaliar a permanência de bactérias nas membranas depois do teste de inativação bacteriana procedeu-se como descrito no 5.5.2.

### **8.2.5 Teste controle PBS e Oxacilina Sódica 500 mg (6,25mg/L) por 8 e 24 horas**

As membranas contaminadas (Seção 5.4.1 (MC)) foram posicionadas na câmara de filtragem. Um volume de 100 mL de PBS e Oxacilina 6,25 mg/L foi circulado no sistema submetido a baixa temperatura (15-17 °C). Os experimentos foram realizados sem irradiação e com um tempo de perfusão total de 8 e 24 horas cada um. Com o sistema em circulação foram feitas coletas do perfusato nos tempos: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 180, 240, 300, 360, 420 e 480 minutos, no caso do teste controle de 8 horas de duração. No teste controle feito por 24 horas, as coletas foram feitas nos tempos: 0, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 1380 e 1440 min. Após de cada coleta, foi feita uma diluição seriada  $10^{-5}$ . Na sequência, foi feito o plaqueamento em triplicata, espalhando as diluições em placas de Petri com meio BHI ágar, as quais foram incubadas durante 24 horas a 37 °C para posterior quantificação do número de bactérias. Para avaliar a permanência de bactérias nas membranas depois do teste de inativação bacteriana, procedeu-se como descrito na seção 5.5.2.

## **8.3 Resultados e discussão**

Antes de fazer os testes combinando a radiação ultravioleta C com a Oxacilina Sódica 500 mg foi necessário demonstrar a estabilidade do poder bactericida do antibiótico após de 4 horas de irradiação com UV-C (254 nm) assim como determinar a concentração mínima inibitória (MIC) do antibiótico.

Os resultados do teste de estabilidade do poder bactericida da Oxacilina Sódica 500 mg após de 4 horas de irradiação com UV-C mostra-se na Figura 16, observando-se que, durante as 4 horas de irradiação o nível de contaminação bacteriano manteve-se estável em 5 log<sub>10</sub>

resultado que demonstra que o poder bactericida da Oxacilina Sódica 500 mg não se vê afetado pela radiação ultravioleta C.

No teste feito na placa de 96 poços para determinar a concentração mínima inibitória da Oxacilina foi observada a mudança de cor de roxo para rosa a partir dos poços das colunas 5 a 10 das fileiras A, B e C, além do controle positivo, indicativo de crescimento bacteriano. Tendo em conta que os poços mais próximos àquele que mostrou crescimento bacteriano foram os da coluna 4, podemos dizer que a concentração mínima na qual o antibiótico é capaz de inibir o crescimento do *S. aureus* foi de 6,25 mg/L.

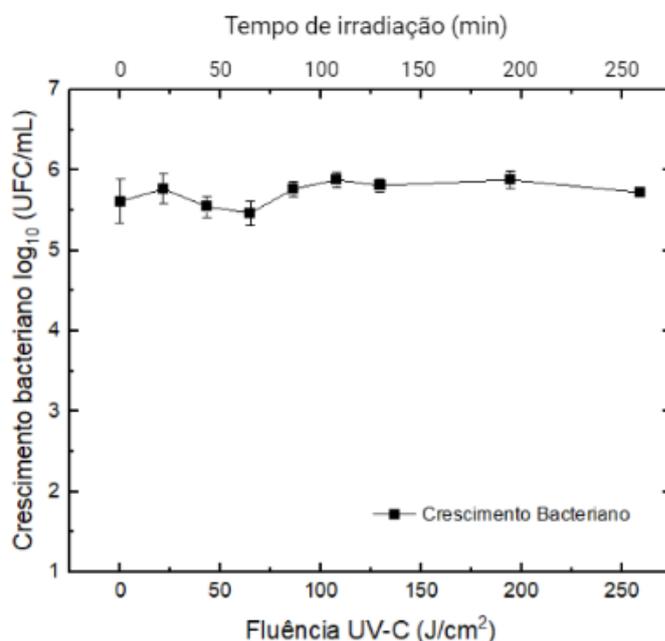


Figura 16 - Efeito da irradiação ultravioleta UV-C (254 nm) na estabilidade do poder bactericida da Oxacilina Sódica 500mg em PBS após de 240 min de irradiação com UV-C. Os eixos indicam crescimento bacteriano log<sub>10</sub> em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e a fluência em J/cm<sup>2</sup> durante 240 min

Fonte: Elaborada pela autora

Os resultados do teste inativação combinando da radiação ultravioleta C com Oxacilina Sódica 6,25 mg/L se evidenciam na Figura 17, mostrando a redução de 7 log<sub>10</sub> UFC/mL correspondendo a uma inativação da totalidade das bactérias circulantes no PBS após de 60 min de irradiação com uma fluência de 64,8 J/cm<sup>2</sup>, embora, as 3 horas restantes do experimento aonde foi desligada a luz e adicionou-se a Oxacilina Sódica 500 mg 6,25 mg/L não se observou mudança no comportamento. Por outro lado, no grupo controle (não irradiado), aonde se circulou pelo sistema o PBS com a Oxacilina Sódica durante 4 horas, foi reduzido apenas 1 log (UFC/mL).

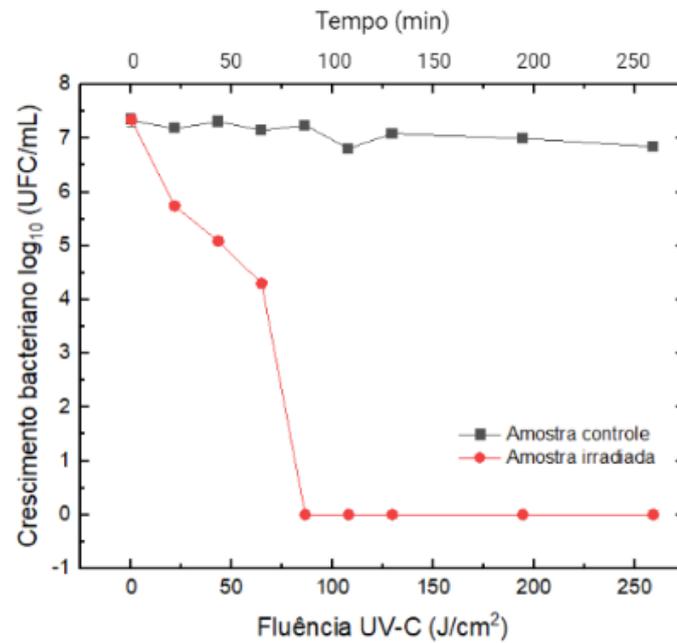


Figura 17 - Efeito da combinação da irradiação ultravioleta UV-C (254 nm) e a Oxacilina Sódica 500 mg na inativação bacteriana em PBS por 240 min usando a câmara de filtragem contendo membranas contaminadas com *S. aureus* planctônicas. Os eixos indicam crescimento bacteriano log<sub>10</sub> em unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL) e a fluência em J/cm<sup>2</sup>. As amostras do grupo controle são mostradas com quadrados pretos e as amostras do grupo irradiado com círculos vermelhos.

Fonte: Elaborada pela autora

O gráfico representado na Figura 18 mostra a permanência de *S. aureus* nas membranas após do banho ultrassônico e coleta de *swab* nos testes controle e irradiado feito nas membranas nos testes controle e irradiado. Constatou-se que a contaminação bacteriana residual esteve presente nas membranas para ambos os métodos de amostragem.

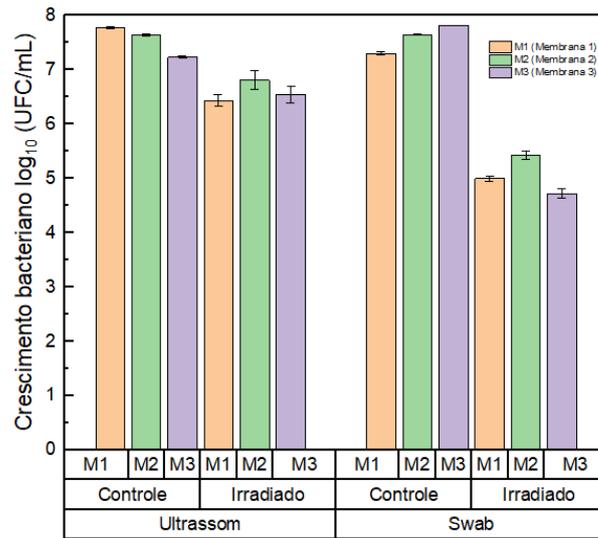


Figura 18 - Reminiscência de *S. aureus* em membranas após do banho ultrassônico e coleta de swab nos testes controle e irradiado. As barras laranja, verde e roxa representam as membranas um (M1), dois (M2) e três (M3) respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora

Os resultados do teste de inativação bacteriana fazendo circular a Oxacilina Sódica em PBS durante 8 horas são apresentados na Figura 19, onde pode se observar uma pequena redução bacteriana, apenas de 1 log (UFC/mL).

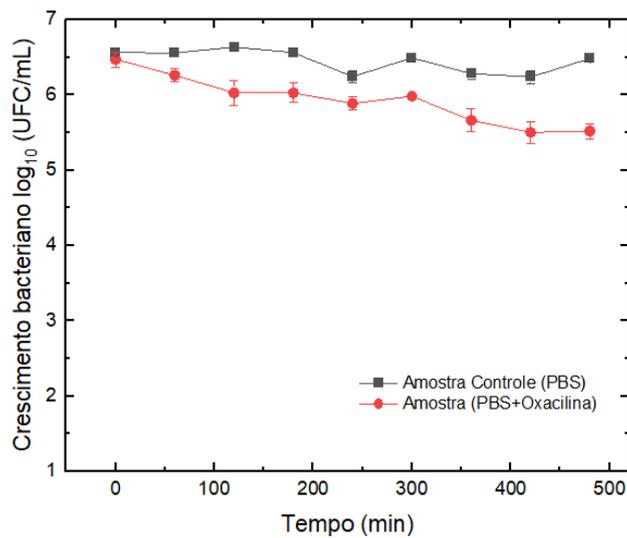


Figura 19 - Efeito da Oxacilina Sódica 500 mg na inativação de *S. aureus* após de 8 horas circulando em PBS. Os eixos indicam crescimento bacteriano log<sub>10</sub> em unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL) e tempo em minutos. As amostras do grupo controle (circulando PBS) são mostradas com quadrados pretos e as amostras com círculos vermelhos representam a amostra circulando PBS e Oxacilina.

Fonte: Elaborada pela autora.

O gráfico da Figura 20 mostra o comportamento do crescimento bacteriano quando se faz circular a Oxacilina em PBS durante 24 horas, sendo que durante as primeiras 8 horas se observa que uma redução de 1log UFC/mL e passadas as 23 a 24 horas cetera.

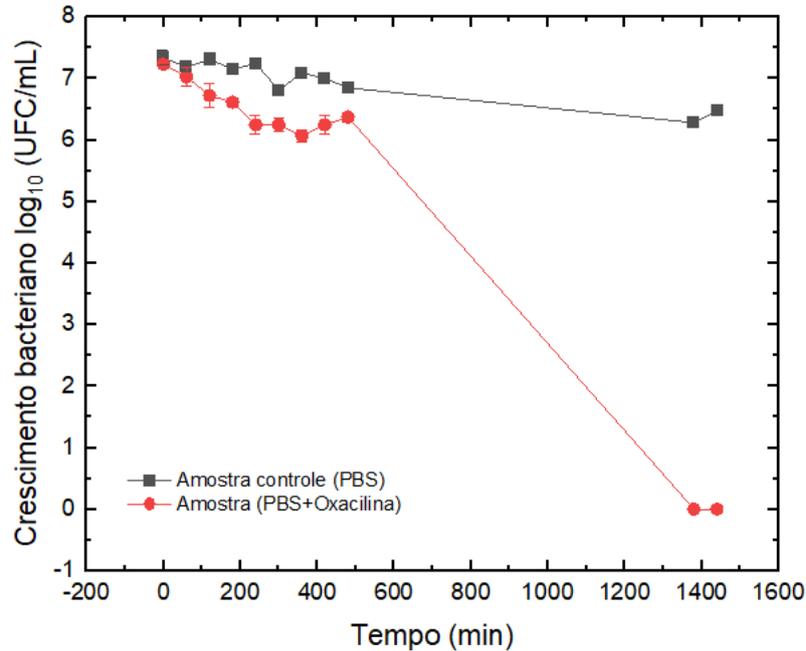


Figura 20 - Efeito da Oxacilina Sódica 500 mg na inativação de *S. aureus* após de 24 horas circulando em PBS. Os eixos indicam crescimento bacteriano log<sub>10</sub> em unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL) e tempo em minutos. As amostras do grupo controle (circulando PBS) são mostradas com quadrados pretos e as amostras com círculos vermelhos representam a amostra circulando PBS e Oxacilina.

Fonte: Elaborada pela autora

Embora, após do banho ultrassônico aonde foi feita a coleta da solução e coleta tipo *swab* nas membranas nos testes controle feitos durante 8 e 24 horas constatou-se a permanência de *S. aureus* nas membranas, sendo que, a contaminação bacteriana residual esteve presente nas membranas para ambos métodos, valores que se mostram na Tabela 2.

Tabela 2 - Remanescência de bactérias nas membranas após do processo de inativação de *S. aureus* fazendo circular a Oxacilina Sódica 500 mg em PBS durante 8 e 24 horas.

Tempo de circulação	Ultrassom			Swab		
	M1	M2	M3	M1	M2	M3
8 horas	7.22 ± 0.12	7.27 ± 0.05	7.42 ± 0.04	4.05 ± 0.01	5.60 ± 0.03	4.07 ± 0.01
24 horas	7.01 ± 0,04	7,37 ± 0,02	7,55 ± 0,07	5,40 ± 0,04	5,37 ± 0,11	5,61 ± 0,04

Fonte: Elaborada pela autora

Com o desenvolvimento dos testes aonde se combina a utilização da radiação UV-C por 1 hora e a adição da Oxacilina Sódica 500 mg no líquido circulante as 3 horas restantes do experimento para a inativação bacteriana no modelo *in vitro* no qual foi utilizada a câmara de filtragem de sentido único contendo três membranas contaminadas com *S. aureus* formando biofilme simulando o órgão e sua estrutura interna, demonstrou-se que com 1 hora de irradiação com UV-C obteve-se a redução da totalidade das bactérias circulantes no PBS inativando 7 log<sub>10</sub> UFC/mL com uma fluência de 64,8 J/cm<sup>2</sup>. Embora, a incorporação do antibiótico nas 3 horas restantes do experimento não fez diferença nos resultados já obtidos; sendo que não contribuiu positivamente na diminuição da carga bacteriana residual constatando-se a contaminação bacteriana remanescente nas membranas de 4 a 7 log<sub>10</sub> UFC/mL após do processo de inativação.

Ao analisar os resultados aumentando o tempo de perfusão e consequente circulação da Oxacilina sódica 500 mg a 6,25 mg/L no PBS por 8 horas, a diminuição da carga bacteriana obtida foi de apenas de 1log UFC/mL após de 8 horas. Na avaliação do tempo de 24 horas de tratamento, a inativação das bactérias circulantes foi completa, mesmo no grupo sem UV-C. Neste caso, a morte bacteriana foi ocasionada pela ação do antibiótico, mas também pela ausência de nutrientes no líquido de perfusão. Vale ressaltar, que foi possível a recuperação de células viáveis das membranas mesmo após o tempo de 24 horas (Tabela 2).

#### **8.4 Conclusões Parciais**

A utilização da Oxacilina sódica 500 mg em 6,25 mg/L não apresentou uma resposta para a redução da carga bacteriana residual no modelo de membranas em períodos de tempo compatíveis da perfusão *ex vivo* de órgãos sólidos.

Desta forma, outros métodos para promover um maior desprendimento bacteriano e para o tratamento do foco ativo da infecção ainda devem ser estabelecidos.

## **9 Descontaminação de órgãos *in vitro* com Terapia Fotodinâmica simulando a perfusão *ex vivo* do órgão usando a câmara de filtração contendo membranas contaminadas com *S. aureus* formando biofilme**

A Terapia Fotodinâmica (TFD) associada à perfusão *ex vivo* já foi testada em modelo porcino de pulmão infectado pelo vírus da hepatite C,<sup>60, 61</sup> com resultados favoráveis. Adicionalmente, essa técnica apresenta o potencial de uso para tratamento direto do órgão, uma vez que é um método comprovadamente eficaz no tratamento de tecidos infectados por diversos tipos de patógenos. Nesse capítulo são apresentados os resultados do experimento avaliando a resposta da TFD com azul de metileno (AM) associada à perfusão do Custodiol (líquido de preservação de órgãos para transplante).

Inicialmente foram feitos os testes de fotodegradação do Custodiol e do AM 0,01% em Custodiol para avaliar as possíveis modificações do líquido de preservação e das propriedades ópticas do fotossensibilizador nesse solvente, assim como uma medida indireta da resposta fotodinâmica. A citotoxicidade da solução do Custodiol-AM irradiada foi testada em fibroblastos. Para avaliar a efetividade e eficiência da TFD na inativação das *S. aureus* que se encontravam no meio testes de inativação foram desenvolvidos utilizando a câmara de filtração contendo membranas contaminadas com biofilmes de *S.aureus*, como descrito no capítulo 6.

### **9.1 Objetivos específicos**

- Avaliar a fotodegradação do Custodiol® e do azul de metileno 0,01% em Custodiol® quando é iluminado com luz vermelha (660 nm).
- Avaliar a citotoxicidade de Custodiol® com azul de metileno irradiado em células de mamíferos (fibroblastos)
- Avaliar a efetividade da Terapia Fotodinâmica (660 nm) na inativação de *S. aureus* no líquido circulante.

### **9.2 Materiais e Métodos**

#### **9.2.1 Módulo de descontaminação**

O módulo de descontaminação utilizado para o desenvolvimento dos experimentos de inativação é o descrito na Figura 6 modificando a fonte de irradiação.

A fonte de irradiação usada é um equipamento desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT, Instituto de Física de São Carlos-IFSC) da Universidade de São Paulo (Figura 21). O dispositivo de descontaminação de fluidos, montado sobre uma plataforma plana tem quatro arranjos lineares de diodos emissores de luz (LED) simetricamente dispostos em torno de um tubo de quartzo inseridas num suporte tubular que impede que a luz escape da cavidade iluminada. Os LEDs apresentam uma emissão centrada em 660 nm. Essa disposição geométrica para a irradiação permite iluminar perimetralmente todo o líquido circulando no tubo. No centro da distribuição geométrica das fontes de luz, um tubo de quartzo possibilita a irradiação do líquido circulante. O suporte tubular será montado de forma que um sensor de segurança evite que ele seja ativado inadvertidamente, enquanto o suporte estiver aberto. Um botão do tipo “liga/desliga” estará disponível na caixa com reatores adjacentes ao sistema, de modo que os reatores alimentem as lâmpadas. Um conector de alimentação AC bivolt (127 V/220 V) fará a alimentação externa do dispositivo a partir da rede elétrica.



Figura 21 - Imagem ilustrativa da fonte de irradiação (660nm) utilizada para a inativação fotodinâmica de *S. aureus* em meio circulante.

Fonte: Elaborada pela autora

### 9.2.2 Fotossensibilizador Azul de Metileno

O Azul de Metileno (AM) é um fotossensibilizador FS aromático, heterocíclico, fenotiazínico, solúvel em água, de fórmula molecular  $C_{16}H_{18}N_3S$  e massa molar 319,85 g/mol. O AM é usado como indicador e como corante bacteriológico, apresenta diversas aplicações nos mais variados campos, como da biologia e da química.

O AM é um FS catiônico, gerando uma ligação eletrostática na superfície celular externa, ocasionando em uma lesão inicial em sua parede e levando uma alta ação fotodinâmica

antibacteriana.<sup>150</sup> O AM, em solução aquosa, é encontrado na forma de monômeros (soluções diluídas), dímeros e agregados maiores (soluções muito concentradas), sendo estes diferenciados pelas respectivas bandas de absorção, máximos em 664 nm, 600 nm e 550 nm.<sup>151</sup> Com isso, este grupo de corantes possui elevada absorção em comprimentos de onda de 600 a 660 nm, região do espectro vermelho de radiação favorável à PDT devido à eficiente penetração da luz em tecidos biológicos.<sup>152</sup> Além disso, é um FS acessível, devido ao seu baixo custo. Os corantes fenotiazínicos são mais eficazes contra bactérias Gram positivas do que em Gram negativas.

### **9.2.3 *S. aureus*: obtenção do inóculo. Contaminação das membranas**

A obtenção das colônias de *S. aureus* ATCC25293 assim como a contaminação das membranas com esfregaços das colônias das bactérias foram feitas seguindo a metodologia descrita nas seções 5.3.1 e 5.4.1 (MC) respectivamente

### **9.2.4 Fotodegradação do Custodiol® e Custodiol® com azul de metileno 0,01% usando luz vermelha (660nm)**

Para a realização do experimento, 30 mL de uma solução de Custodiol®, com e sem azul de metileno, foram iluminadas com luz vermelha (660 nm) mantendo a solução circulando a temperatura ambiente e baixas temperaturas por 1 hora (Figura 22). Amostras da solução foram retiradas nos intervalos de tempo: 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min e colocadas no espectrofotômetro Varian Cary 50 entre os comprimentos de onda de 250 a 800 nm para mensuração da absorbância e posterior processamento dos resultados.



Figura 22 - Imagem ilustrativa do módulo de irradiação utilizado nos experimentos de fotodegradação desenvolvidos variando a temperatura: a: teste de fotodegradação feito a temperatura ambiente; b: teste de fotodegradação feito a baixas temperaturas (4-8°C).

Fonte: Elaborada pela autora

### 9.2.5 Citotoxicidade de Custodiol® com azul de metileno e irradiado em células de mamíferos (fibroblastos)

O ensaio de citotoxicidade do Custodiol® com AM e irradiado foi desenvolvido utilizando células de fibroblastos dérmicos neonatais (HDFn, C0045, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) cultivadas no meio Eagle modificado (Dulbecco, Vitrocell, Campinas, Brasil), complementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell). As células foram semeadas em placas de 96 poços sendo um total de 104 células por poço, deixadas durante 24 h para que se aderisse na placa. Após esse tempo foram incubadas amostras de Custodiol®, Custodiol® com AM 0,01% e irradiadas que foram previamente coletadas nos tempos: 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min. O processo de incubação da placa foi ao longo de 4 horas mantendo uma temperatura de 4°C; passado esse tempo os poços foram lavados 2x com o PBS e foi feito um ensaio colorimétrico para viabilidade celular de MTT – Sigma. Utilizando o meio sem fenol com 10% da solução de MTT as células foram incubadas por 4 horas. Após da incubação leituras de absorbância foram feitas a 570 nm com o Multiskan GO Microplate Spectrophotometer e o desvio padrão dos valores de viabilidade celular foram graficados.<sup>62</sup>

### 9.2.6 Testes de inativação fotodinâmica usando luz vermelha (660 nm) do Custodiol® com azul de metileno 0.01% usando câmara de filtragem com membranas contaminadas com esfregaços de colônias de *S. aureus*.

Para o desenvolvimento do experimento as membranas foram contaminadas com colônias de *S. aureus* que foram obtidas como descrito nas seções 5.3.1, seguindo o protocolo de contaminação descrito na seção 5.4.1 (MC), as quais foram inseridas na câmara de filtragem, como se mostra na Figura 8. Os testes de inativação assim como a quantificação da carga bacteriana remanescente nas membranas depois do processo de inativação foram realizados seguindo os protocolos descritos nas seções 5.5.1 e 5.5.2, respetivamente. As modificações no protocolo foram a solução de Custodiol® com AM 0,01% e a fonte de irradiação em 660 nm.

### 9.3 Resultados e discussão

Os valores da dose de entrega para cada tempo foram calculados usando a Equação 1, onde  $D$  é a fluência em ( $J/cm^2$ ),  $I$  é a irradiância expressa em ( $W/cm^2$ ) e  $t$  representa o tempo em (s). A Tabela 3 mostra os valores calculados para a irradiância de  $0,03 W/cm^2$  do sistema empregado.

$$D = I * t \quad \left[ \frac{J}{cm^2} \right] \quad (1)$$

Tabela 3 - Valor da fluência calculada para cada tempo de irradiação no qual foram coletadas as amostras.

Tempo (min)	Dose ( $J/cm^2$ )
0	0
5	9
10	18
20	36
30	54
40	72
50	90
60	108
80	144
100	180
120	216
180	324
240	432

Fonte: Elaborada pela autora

Com o intuito de saber se ocorre uma degradação ou são modificadas as características do Custodiol® com e sem AM quando iluminado com luz vermelha (660 nm), foram desenvolvidos testes a temperatura ambiente e a baixas temperaturas (4-8 °C) (Figura 24) aonde amostras foram coletadas ao longo de 1 hora de iluminação do líquido circulante e analisadas no espectro de UV-visível. Como os resultados obtidos foram muito similares tanto nos testes realizados a temperatura ambiente quanto nos testes feitos a baixas temperaturas, mostramos os resultados obtidos nos testes realizados a baixas temperaturas, tendo em conta que a perfusão do órgão é feita a temperaturas baixas.

No gráfico da Figura 23 mostram-se o espectro de absorção visível da solução Custodiol® mantida em circulação e irradiada durante 1h com luz vermelha (660 nm). Como pode se observar o Custodiol® mostra degradação, evidenciando-se alterações nas bandas quando comparadas com o controle (Custodiol® sem irradiar) após de 1 hora de iluminação com uma fluência de 108 J/cm<sup>2</sup>.

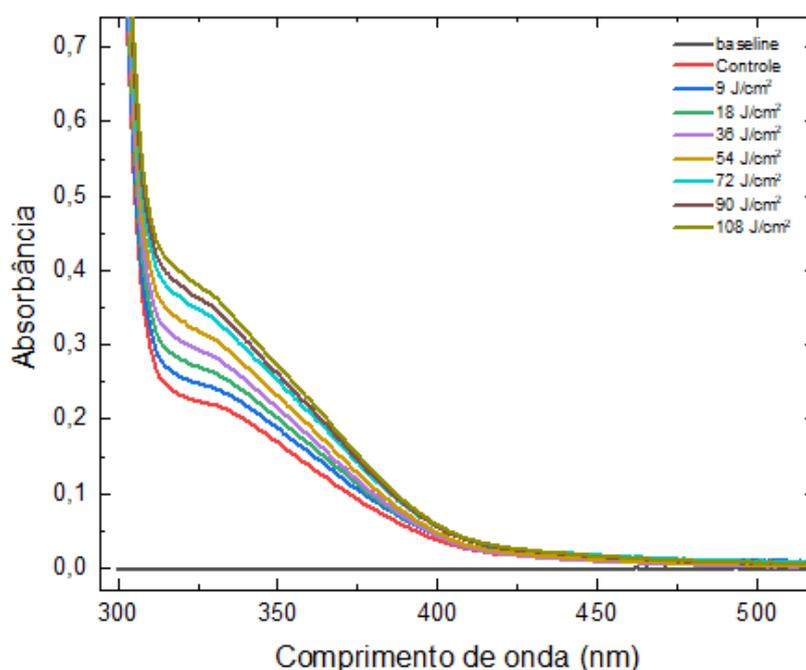


Figura 23 - Espectro de absorção na região UV visível da solução Custodiol® mantida em circulação e irradiada durante 1h com luz vermelha (660 nm).

Fonte: Elaborada pela autora

O espectro de absorção do Custodiol® sofre alterações ao longo do tempo, com o aumento relativo da absorção na região entre 300 e 400 nm, no entanto, sob as condições de irradiação utilizadas, não houve a formação de fotoprodutos.

Os resultados dos experimentos de fotodegradação do Custodiol® com AM 0,01% iluminando com luz vermelha (660 nm) a solução que circulou pelo sistema durante 1 hora a baixas temperaturas (4-8 °C) são apresentados no gráfico da Figura 24.

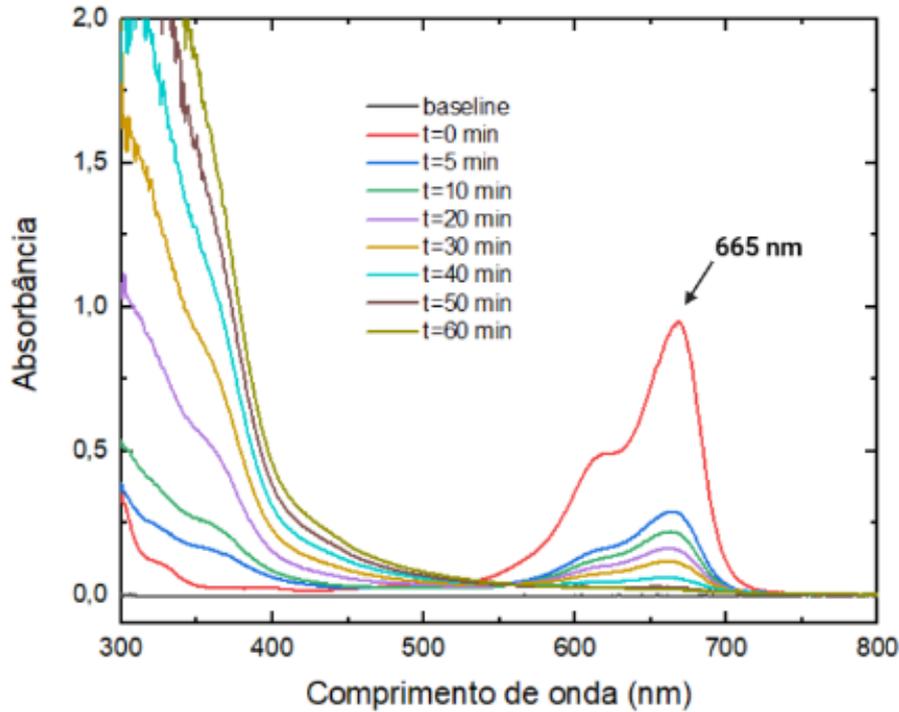


Figura 24 - Espectro de absorção UV-visível da solução Custodiol® com Azul de Metileno 0,01% mantida em circulação e irradiada durante 1h com luz vermelha (660 nm).

Fonte: Elaborada pela autora

Os resultados dos experimentos de fotodegradação do Custodiol® com AM 0,01% iluminando com luz vermelha (660 nm) a solução que circulou pelo sistema durante 1 hora a baixas temperaturas (4-8 °C) mostram-se no gráfico da Figura 24. Como pode se observar a partir dos 40 min de irradiação com luz vermelha (660 nm) é evidente a degradação do AM.

O gráfico da Figura 25 apresenta a alteração da absorção no comprimento de onda de 660 nm em função da fluência entregue. Como pode se observar a partir dos 40 min de irradiação com luz vermelha (660 nm) é evidente a degradação do AM. Essa é um dado importante, pois indica indiretamente que a ação fotodinâmica está ocorrendo mesmo com o AM no Custodiol®, ou seja, na presença de biomoléculas na solução.

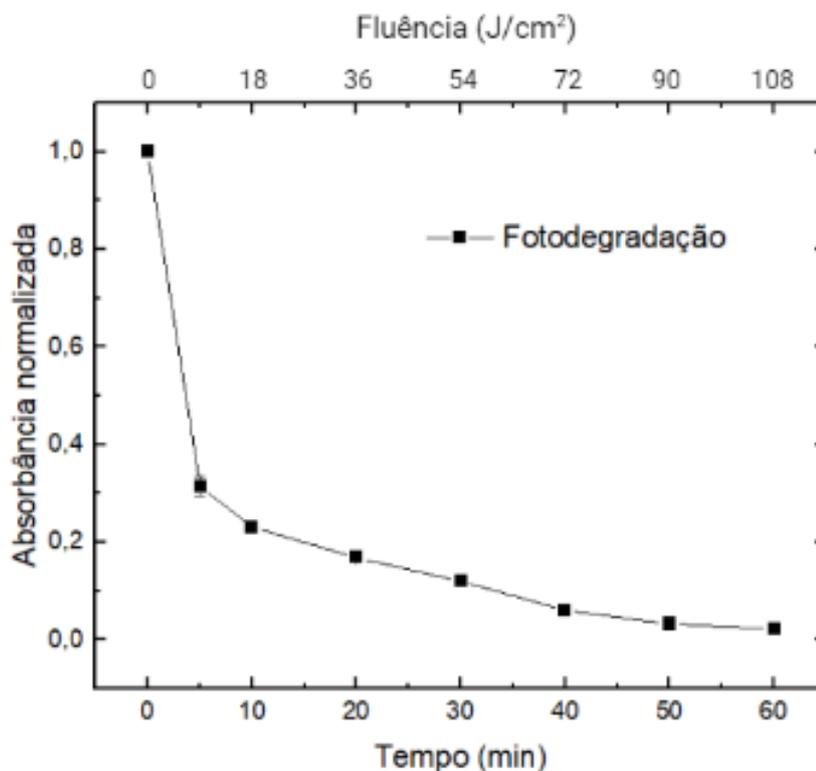


Figura 25 - Fotodegradação do AM no Custodiol® quando irradiado durante 60 min com luz vermelha (660 nm).

Fonte: Elaborada pela autora

O gráfico da Figura 26 mostra os resultados do teste de citotoxicidade da solução de preservação Custodiol® ou HTK com AM 0,01% exposta à irradiação com luz vermelha (660 nm) em fibroblastos durante um tempo total de 60 min de circulação do líquido através do sistema. Ao comparar as amostras de HTK e HTK\_AM sem irradiar com o controle apresentam uma variabilidade da viabilidade muito pequena. A diminuição da viabilidade celular somente é significativa com tempos de irradiação acima de 50 min, sendo que para 60 min, a viabilidade reduziu para 0,4, em comparação ao grupo controle. O aumento da toxicidade pode ser atribuído a um ou dois fatores concomitantes a fotodegradação observada apenas do Custodiol® irradiado e o perfusato com AM irradiado. Como observado nas modificações observadas nos espectros de absorção, a solução do Custodiol® está sendo modificada, podendo perder suas características de preservação da viabilidade celular e/ou com a presença de produtos com maior toxicidade celular.

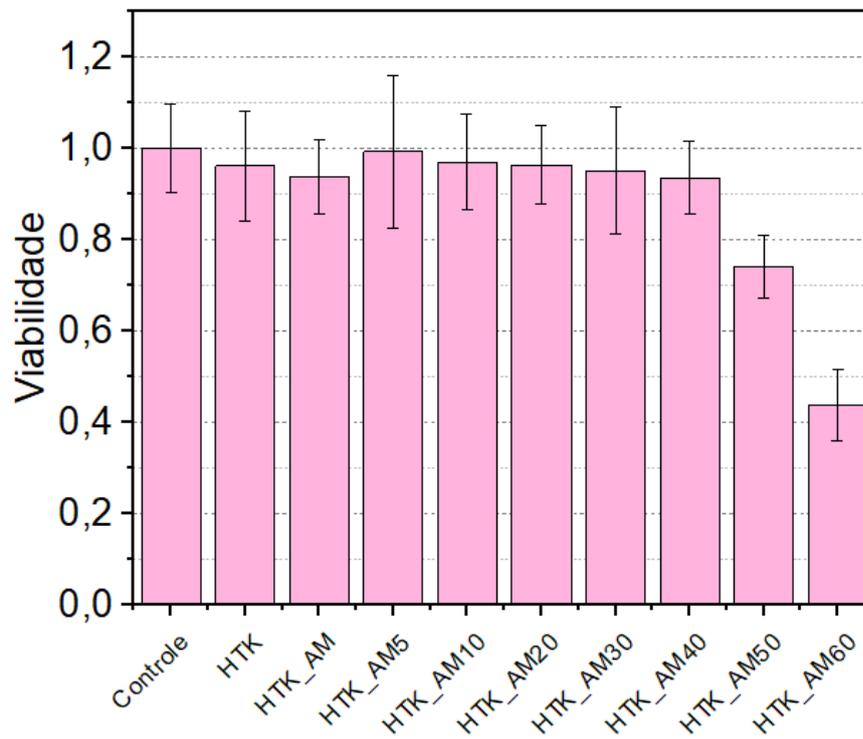


Figura 26 - Citotoxicidade da solução de preservação Custodiol® ou HTK com AM 0,01% exposta à irradiação com luz vermelha (660 nm) em fibroblastos durante um tempo total de 60 min de circulação do líquido através do sistema.

Fonte: Elaborada por Carolina Campos

Finalmente, quando realizados os testes de inativação fotodinâmica do Custodiol® usando como fotossensibilizador o azul de metileno 0,01% e irradiando com luz vermelha (660 nm) os resultados de redução microbiana não foram promissores (Figura 27).

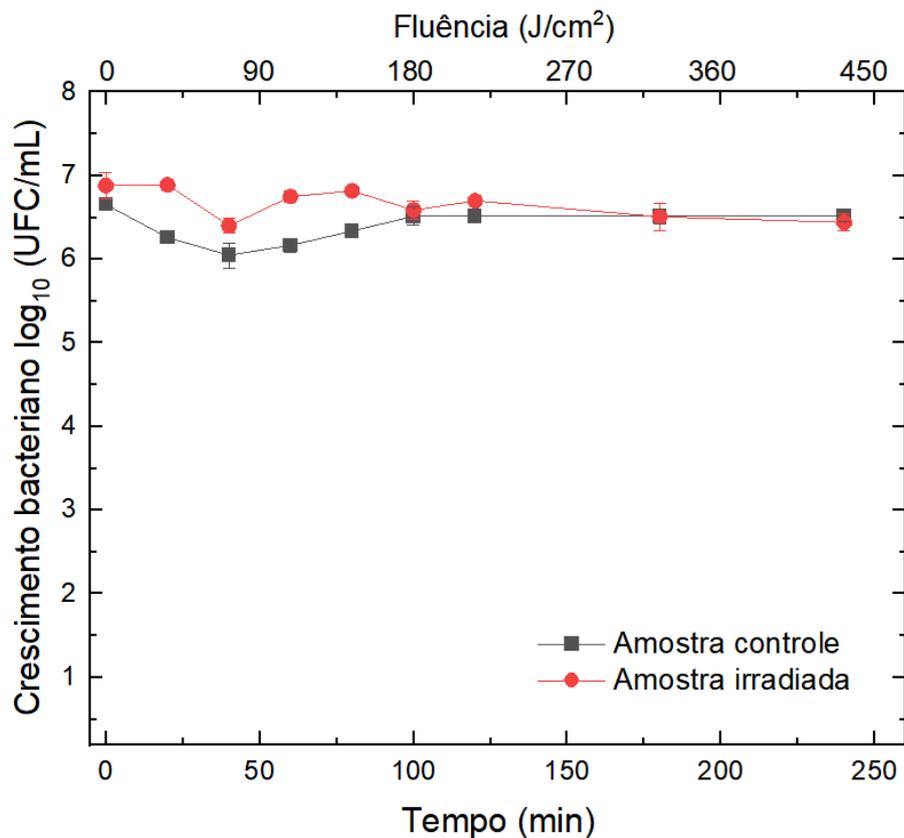


Figura 27 - Efeito da TFD na inativação de *S. aureus* em Custodiol® irradiando com luz vermelha (660 nm) durante 240 min usando como fotossensibilizador o AM. Os pontos pretos e vermelhos mostram as curvas das amostras controle e irradiada respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora

Ao analisar os resultados obtidos do crescimento bacteriano do grupo controle, aonde se circulou a solução de Custodiol® com AM 0,01% durante 4 horas não se observa nenhum indicativo de inativação. No grupo irradiado se pode observar uma pequena tendência a diminuição da carga bacteriana nos primeiros 40 min (72 J/cm<sup>2</sup>), logo depois se observa um aumento da carga bacteriana após dos 40 min até aproximadamente os 100 min (180 J/cm<sup>2</sup>) e depois fica estável até os 240 min (432 J/cm<sup>2</sup>) indicativo de que foi ineficiente o processo de inativação empregado.

Após do teste de inativação fotodinâmica, com e sem luz, as membranas foram colocadas no ultrassom para desprender as bactérias que ficaram nas membranas e logo depois foram tomadas amostras de cada uma das membranas tipo *swab*.

Na tabela 4 mostram-se os resultados do grupo controle e irradiado, constatando a permanência de altas cargas de *S. aureus* nas membranas, sendo de 6 a 7 log (UFC/mL), reproduzindo novamente os resultados anteriores com o UV-C.

Tabela 4 - Carga bacteriana residual nas membranas após do processo de inativação de *S. aureus* aplicando a TFD no Custodio com AM 0,01% circulante 4 horas.

TESTES	PDT HTK_AM 0,01%					
	Ultrassom			Swab		
	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>
CONTROLE	7,88 ± 0,02	7,21 ± 0,17	7,57 ± 0,03	6,91 ± 0,06	7,17 ± 0,05	6,98 ± 0,08
IRRADIADO	7,78 ± 0,01	7,79 ± 0,07	7,74 ± 0,05	6,91 ± 0,03	6,81 ± 0,04	6,85 ± 0,12

Fonte: Elaborada pela autora

Tendo em conta os resultados obtidos no teste de fotodegradação do AM no Custodiol, aonde demonstrou-se a degradação do AM a partir dos 40 min de irradiação decidiu-se fazer outro teste de inativação igual que o anterior, mas adicionando 2 mL de AM 0,01% cada 30 min antes da degradação do AM que se encontra na solução, para comprovar se a ausência de resposta era decorrente de uma alta fotodegradação no período inicial e consequente ausência de moléculas ativas nos períodos finais de irradiação. Os resultados são mostrados no gráfico da Figura 28. Comparado ao resultado com uma única administração do AM (figura 27), pode-se observar que a redução observada foi também de apenas 1 log<sub>10</sub>, com a tendência de manutenção da resposta por um período mais prolongado. No entanto, considerando a efetividade como tratamento antimicrobiano, mesmo esse protocolo não mostrou eficiência.

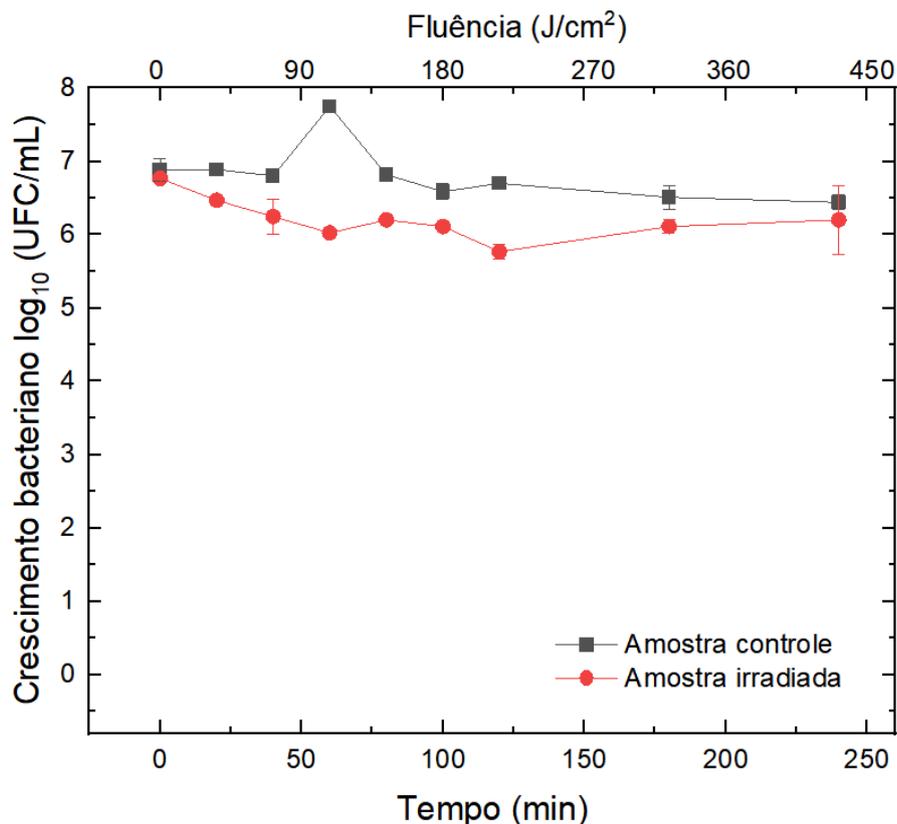


Figura 28 - Efeito da TFD na inativação de *S. aureus* em Custodiol® com AM irradiando com luz vermelha (660 nm) durante 240 min, mantendo o líquido circulando e adicionando 2 mL de AM cada 30 min. Os pontos pretos e vermelhos mostram as curvas das amostras controle e irradiada respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora

Os mecanismos dessa pobre resposta serão investigados, uma das hipóteses é a de que as biomoléculas presentes no Custodiol® atuam como outros alvos da interação do fotossensibilizador e do oxigênio singleto, reduzindo a ação fotodinâmica sobre as bactérias. Algo similar aconteceu em um estudo *in vitro* onde a adição do surfactante pulmonar Survanta® reduziu o efeito do aPDT da indocianina verde, Photodithazine®, bacterioclorintrizma e protoporfirina IX contra *Streptococcus pneumoniae* <sup>153</sup>

Como nos experimentos anteriores, o método de tratar apenas o perfusato circulante não apresentou nenhuma resposta na carga bacteriana do foco de infecção (Tabela 5).

Tabela 5 - Remanescência de bactérias nas membranas após do processo de inativação de *S. aureus* aplicando a TFD no Custodio com AM 0,01% circulante durante 4 horas, adicionando 2 mL de AM 0,01% cada 30 min.

Testes	PDT HTK_AM 0,01%					
	(Adicionando 2 mL de AM 0,01% c/30 min)					
	Ultrassom			Swab		
	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>
<b>Controle</b>	7,42±0,09	7,46±0,03	7,36±0,09	7,09±0,09	6,81±0,13	6,67±0,17
<b>Irrradiado</b>	7,13±0,01	7,02±0,09	7,57±0,03	7,18±0,13	6,77±0,17	7,21±0,02

Fonte: Elaborada pela autora

#### 9.4 Conclusões Parciais

- A incidência da luz vermelha (660 nm) no Custodiol que circulou durante 1 hora pelo sistema de descontaminação provocou alterações no líquido de preservação de órgãos.
- Quando o Custodiol com AM 0,01% é irradiado com luz vermelha (660 nm) constatou-se que após dos 40 min de irradiação e aplicando uma fluência de 72 J/cm<sup>2</sup> o AM 0,01% começa a degradar-se.
- Constatou-se o aumento da citotoxicidade do Custodiol com AM 0,01% a partir dos 40 min de irradiação com luz vermelha (660 nm).
- O processo de inativação fotodinâmica bacteriana quando utilizado o AM 0,01% como fotossensibilizador numa solução de Custodiol não apresentou resposta significativa.



## **10 Descontaminação de fígados de ratos Wistar machos simulando a perfusão *ex vivo* do órgão usando a radiação ultravioleta C para a inativação de *S. aureus* no líquido circulante**

### **10.1 Objetivos específicos**

- Desenvolver modelo experimental que conjugue a perfusão *ex vivo* do órgão e a Radiação Ultravioleta C (254 nm) como alternativa para a descontaminação do fígado de rato Wistar contaminado com *S. aureus*.
- Avaliar a efetividade da Radiação Ultravioleta C (254 nm) na inativação de *S. aureus* no perfusato no modelo *ex vivo* do fígado de ratos Wistar.

### **10.2 Materiais e Métodos**

#### **10.2.1 Sistema de perfusão do fígado combinado com modulo de irradiação UV-C**

Para o desenvolvimento do experimento simulando a perfusão *ex vivo* do fígado usando a radiação ultravioleta C para a inativação de *S. aureus* no líquido circulante, dado o tamanho do fígado e volume de líquido que ele admite, utilizamos uma máquina de perfusão adaptada a estas condições. Foi concebido um modelo no qual foi possível a perfusão do órgão usando uma bomba de microinfusão para a circulação do perfusato no fígado e a descontaminação do perfusato coletado foi realizada usando o mesmo sistema descrito na seção 5.1 (Figura 28).

A perfusão do fígado de rato foi feita através de um sistema de perfusão constituído por uma bomba de infusão programável Scienlabor bivolt de 150 mm de alto, 175 mm de largura e 350 mm de comprimento que consta de fuso e guias em aço inox com acionamento por motor de passo de alta precisão. A bomba de infusão aceita duas seringas intercambiáveis que podem ser de tamanhos e modelos variados, com uma taxa de infusão de 0,01 (o mais lento) até 999,99  $\mu\text{L}/\text{h}$  ou min (o mais rápido), com a possibilidade de programar os parâmetros de tempo e volume, podendo selecionar a taxa de infusão em horas ou minutos e volume de infusão em mL ou  $\mu\text{L}$ .

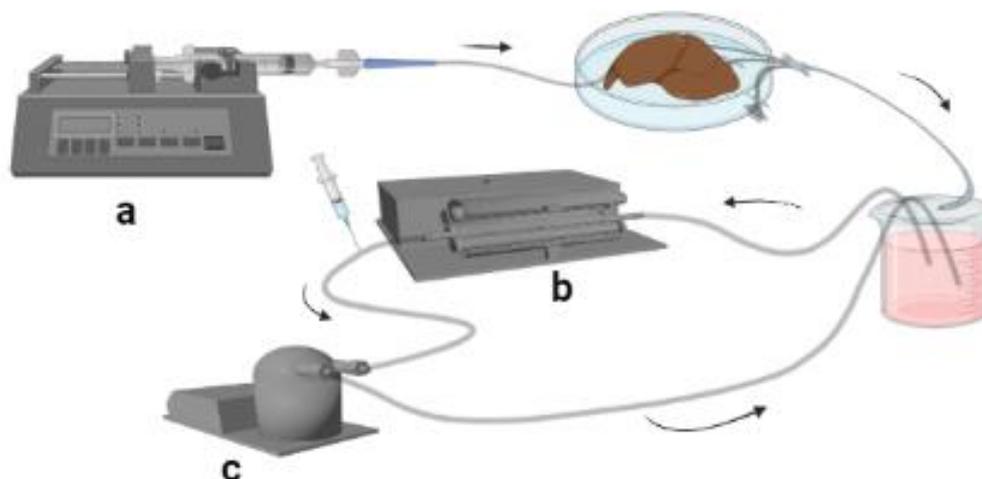


Figura 29 - Imagem ilustrativa do sistema de perfusão de fígado combinado com o módulo de irradiação UV-C: *a* indica a bomba de infusão programável de duas seringas; *b* indica a fonte de irradiação de luz UV-C; e *c* a bomba peristáltica.

Fonte: Elaborada pela autora

### 10.2.2 Linhagem animal

Para desenvolver os experimentos *in vivo* foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar, com pesos entre 200 e 300g, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo. Os ratos foram mantidos num alojamento para animais montado no Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP), no Laboratório de Biofotônica do Grupo de Óptica, em estante ventilada (Alesco®) com sistema de climatização controlada. Em cada gaiola foram alojados três animais com o assoalho forrado com maravalha, recebendo água filtrada e ração comercial específica para roedores, ambos *ad libitum*. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do IFSC (anexo 2).

### 10.2.3 Obtenção do inóculo para indução da infecção

Para o preparo do inóculo reativou-se a cepa de *S. aureus* ATCC25293 espalhando 10 µL da bactéria (mantida previamente no congelador) em placa contendo Ágar BHI e foi colocada na estufa DBO da Electrolab® modelo EL 101/3 submetida a uma temperatura de 37 °C por 48 horas. Após esse tempo, preparou-se o pré-inóculo, transferindo 8 colônias de *S. aureus* para um tubo tipo Falcon contendo 10 mL de Ágar BHI líquido que foi colocado na

incubadora tipo *shaker* SL-22 da SOLAB mantido sob agitação a 150 rpm por 18 horas a 37 °C. Passado esse tempo de incubação, preparou-se o inoculo em BHI líquido na proporção 1:10 (volume), levou-se novamente para a incubadora tipo *shaker* SL-22 por mais 4 horas.

Posteriormente, foi medida a absorvância da suspensão no espectrofotômetro Varian Cary 50 no comprimento de onda em 600 nm e uma alíquota de 400 µL da solução foi plaqueada em triplicata em cinco diluições. Na sequência, o tubo Falcon contendo o inoculo foi colocado na centrífuga a 3.000 rpm por 10 minutos, para a separação das bactérias do BHI. O líquido sobrenadante foi jogado fora e adicionado PBS no mesmo volume de BHI (sobrenadante), sendo repetida a centrifugação duas vezes. Após descarte do sobrenadante, as bactérias foram misturadas com a mucina (Sigma Aldrich®) preparada com antecedência diluindo-a em água estéril na concentração de 0,05 g/mL e colocada em vórtice, até a obtenção de uma solução totalmente homogênea.<sup>154</sup>

#### 10.2.4 Modelo animal de infecção sistêmica

Para indução da neutropenia dos ratos, com o intuito de viabilizar a infecção, foi desenvolvida uma modificação do protocolo já descrito por Vivekanandan *et al.*, 2018<sup>155</sup> utilizando a ciclofosfamida como agente imunossupressor. As modificações realizadas foram feitas em testes pilotos, sendo: a via de administração do imunossupressor, a concentração do inóculo, o tempo de espera depois de inoculada a infecção e o tempo que foi mantida a neutropenia nos ratos.

Para desenvolver o estudo piloto do modelo de infecção utilizaram-se 6 ratos Wistar machos: em 3 deles a neutropenia foi mantida por 5 dias, aplicando uma dose diária, via subcutânea, com Ciclofosfamida 200 mg (Genuxal®, fabricado por Baxter Oncology GmbH, Alemanha) por 4 dias consecutivos: injetando uma dose diária de 150 mg/kg (peso corpóreo) nos primeiros 4 dias e no quinto dia, uma dose de 100 mg/kg. No sexto dia, o inoculo de 0,2 mL de *S. aureus* ( $10^8 \log$  UFC/mL) em mucina gástrica suína a 5% foi injetado via subcutânea.<sup>153-154</sup> Nos outros 3 animais, a neutropenia foi mantida por 4 dias aplicando uma dose diária via subcutânea com Ciclofosfamida 200 mg (Genuxal®, fabricado por Baxter Oncology GmbH, Alemanha) por 4 dias consecutivos: injetando uma dose diária de 150 mg/kg (peso corpóreo) nos primeiros 3 dias e no quarto dia, uma dose de 100 mg/kg. No quinto dia, foi inoculada a bactéria como explicado anteriormente. Após de 4 horas da inoculação da

infecção foi feita a cirurgia para a extração dos fígados, e posterior plaqueamento da solução extraída por filtração do macerado dos órgãos.

#### 10.2.5 Cirurgia para extração de fígado e canulação para perfusão

Anterior à cirurgia, os ratos foram submetidos ao jejum de 12 horas. Uma solução de 80-90 mg/Kg Cloridrato de Cetamina e 10-15 mg/kg de Cloridrato de Xilasina (Sespo Ind. Com. Ltda.) foi injetada via intraperitoneal. Essa associação induz uma sedação em torno de 30 min, quando necessário se pode administrar mais 10% da dose, e para o procedimento de morte é administrado o dobro da dose inicial para o animal.<sup>156</sup> Logo antes da retirada do fígado, 0,3 mL de Heparina 0,2% foi administrada via veia peniana para evitar a coagulação do sangue no órgão.

A cirurgia foi feita fazendo uma abertura da parede abdominal por meio de incisão mediana e transversal (em "T").<sup>157</sup> Posteriormente, foi realizada a dissecação da parte proximal da veia mesentérica superior e da veia porta até o hilo hepático por meio da ligadura e secção das veias esplênica e gástrica esquerda; a dissecação da aorta abdominal por meio de ligadura e secção das artérias renal esquerda e direita, artéria mesentérica superior, artéria esplênica e artérias gástrica esquerda e direita para construção de manguito compreendendo a aorta, o tronco celíaco e a artéria hepática assim como a dissecação da veia cava infra e supra-hepática. Depois foi feita a liberação total do fígado da cavidade abdominal por meio da secção de seus ligamentos das veias cava infra- e supra-hepática, da veia porta, e do manguito aorto-celíaco. O fígado foi retirado de seus pedículos vasculares e colocado numa placa do tipo Petri estéril contendo solução de preservação gelada. Rapidamente foi feita a fixação do cateter de dupla via na veia porta e no manguito aorto-celíaco e conexão deste ao sistema de perfusão.<sup>157-158</sup>

Com a abertura da cavidade torácica (por meio do diafragma) e corte dos grandes vasos como aorta, carótidas ou femoral e as veias cava, jugular ou femoral, o rato morre pela perda aguda e massiva da volemia.<sup>159</sup>

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo Dr. Flavio Henrique Ferreira Galvão da Faculdade de Medicina da USP.

#### 10.2.6 Teste de descontaminação de fígado de ratos Wistar machos simulando a perfusão *ex vivo* do órgão usando a radiação ultravioleta c para a inativação de *S. aureus* no líquido circulante

Para desenvolver o teste foram utilizados 8 ratos, dos quais, um morreu minutos depois de receber a inoculação da infecção, assim, nesse estudo foram utilizados 7 fígados. Um cateter de dupla via foi fixado na veia porta e no manguito aorto-celíaco do órgão, e conectado ao sistema de perfusão programado para entregar 50 mL de Custodiol em 10 min. O volume total empregado para a perfusão foi de 200 mL (4 seringas de 50 mL) de Custodiol.

A Figura 29 apresenta um desenho esquemático do processo de descontaminação de fígados de ratos Wistar simulando a perfusão *ex vivo* do órgão usando a radiação ultravioleta C na inativação de *S. aureus* no líquido circulante. O perfusato de saída do órgão foi depositado em um béquer, mantido em gelo para resfriamento. As extremidades dos tubos de entrada e saída da bomba de perfusão também foram posicionadas dentro do béquer. O fluxo de trabalho foi de 200 mL/min e o perfusato foi irradiado dentro do dispositivo de irradiação UVC.

Antes de iniciar a irradiação, uma primeira amostra de 400  $\mu$ L ( $t_0$ ) foi coletada para fazer o plaqueamento controle. A cada 5 min, 50 mL do líquido foram manualmente coletados no béquer com seringa estéril e reintroduzidos na máquina de perfusão para dar continuidade à circulação no fígado. Mantendo o líquido circulando pelo dispositivo de descontaminação e iluminando constantemente coletaram-se amostras nos tempos: 5, 10, 15, 30, 40, 60 min e o plaqueamento em triplicata foi realizado para cada amostra.

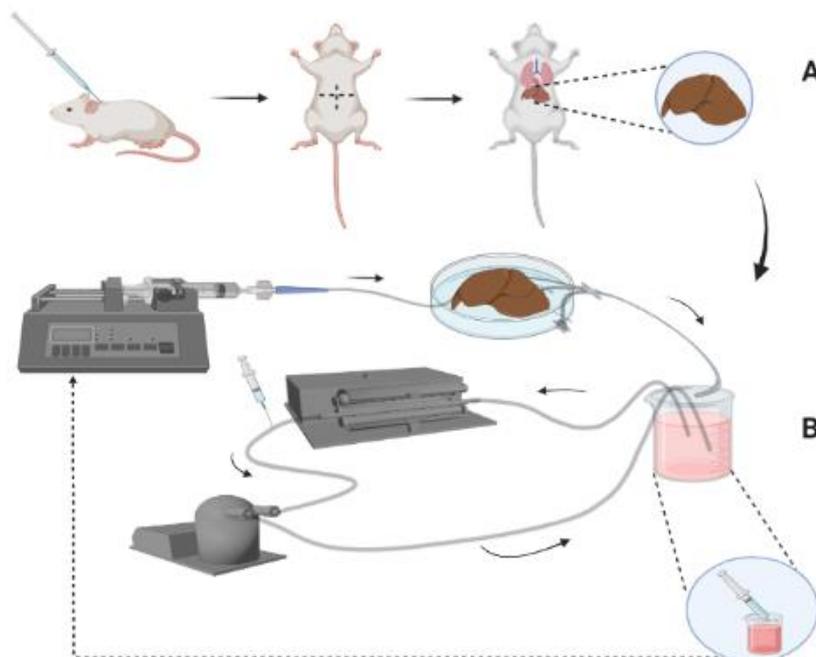


Figura 30 - Esquema descritivo do processo de descontaminação de fígados de ratos Wistar simulando a perfusão *ex vivo* do órgão usando a radiação ultravioleta C na inativação de *S. aureus* no líquido circulante. Painel A: descrição sintetizada do modelo de infecção e cirurgia do rato Wistar feita para a extração do órgão. Painel B: processo de inativação bacteriana do perfusato circulante coletado ao sair do órgão utilizando o módulo de irradiação UV-C constituído pela fonte de irradiação de luz UV-C e a bomba peristáltica.

Fonte: Elaborada pela autora

Após a finalização da perfusão com irradiação *ex vivo* foi realizada a maceração dos fígados para avaliar contaminação residual do órgão. Colocou-se o fígado no almofariz, que foi triturado com ajuda do pistilo, adicionando-se 3 mL de PBS para facilitar a recuperação das bactérias. O macerado foi colocado em um funil com papel filtro para a coleta do líquido. De cada macerado, as amostras foram plaqueadas em triplicata e as placas mantidas na incubadora. No dia seguinte, foi feita a contagem das colônias das bactérias.

#### 10.2.7 Teste de propriedades ópticas do Custodiol e sangue

Para avaliar a influência da presença do sangue no líquido de preservação do órgão quanto aos resultados obtidos na descontaminação de fígado por perfusão *ex vivo*, foi realizado um teste usando 1 mL uma solução de Custodiol e Sangue de Carneiro a diferentes concentrações (entre 0,0625% e 20%, conforme a Tabela 6). A transmitância foi avaliada no

intervalo entre 200-800 nm no espectrofotômetro UV-VIS (Cary® Bio, Varian, Austrália), usando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 mm.

Tabela 6 - Quantidade de sangue e Custodiol utilizados para preparar a solução de Custodiol e sangue de carneiro a diferentes concentrações.

<b>Solução (%)</b>	<b>Sangue (µL)</b>	<b>Custodiol (µL)</b>
20	200	800
10	100	900
5	50	950
2	20	980
1	10	990
0,5	5	995
0,25	2,5	997,5
0,125	1,25	998,75
0,0625	0,625	999,375

Fonte: Elaborada pela autora

### 10.3 Resultados e discussão

Os resultados comparativos do modelo de infecção sistêmica nos ratos Wistar, mantendo a neutropenia por 5 dias (conforme protocolo original) e por 4 dias (protocolo modificado, visando reduzir o risco de morte) são apresentados na Figura 30.

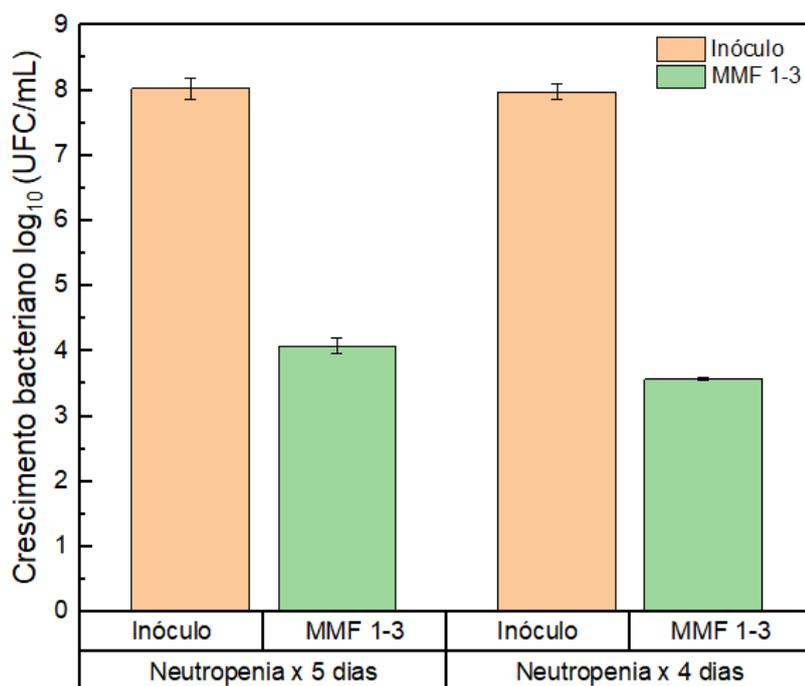


Figura 31 - Resultados do modelo de infecção sistêmica em ratos Wistar mantendo a neutropenia por 5 e 4 dias. As barras laranja mostram o controle (inoculo injetado para indução da infecção) e as barras verdes indicam a recuperação das bactérias encontradas nos fígados após de 4 horas de ter induzido a infecção; MMF1-3 média de log<sub>10</sub> UFC/mL recuperado na maceração dos fígados dos ratos 1 a 3.

Fonte: Elaborada pela autora

Como pode se observar a partir da injeção de um inoculo inicial de 8 log UFC/mL de *S. aureus* (DO: 0,9) em mucina 5% (v/v) após 4 horas da inoculação da infecção, tanto no protocolo aonde foi mantida a neutropenia por 5 dias quanto no qual foi mantida por 4 dias conseguiu-se recuperar 4log UFC/mL, demonstrando que os modelo de infecção utilizados são eficientes para conseguir a contaminação dos fígados dos ratos.

Com base à observação do animal ao longo dos dias mantendo a neutropenia supôs-se que a indução da neutropenia foi severa, pois se observou o mesmo efeito quando foi mantida por 4 dias quanto for mantida por 5 dias: diminuição de peso, caída dos pelos e falta de brilho e alguns deles ficavam com diarreia.

Para determinar se existe diferença estatística nos resultados quando a neutropenia é mantida por 5 ou 4 dias, realizou-se uma prova baseada na comparação das médias pelo teste *t-Student*. Não houve diferença significativa entre os tempos de indução da neutropenia, desta forma, a escolha foi pelo menor tempo, principalmente por minimizar os riscos de perda de animais por uma infecção muito severa.

Assim, o modelo adaptado foi então definido com indução da neutropenia aplicando uma dose diária com Ciclofosfamida 200 mg, via subcutânea por quatro dias consecutivos: injetando uma dose diária de 150 mg/kg (peso corpóreo) nos primeiros três dias e no quarto dia, uma dose de 100 mg/kg. No quinto dia, o inóculo de 0,2 mL de *S. aureus* (8 log UFC/mL) em mucina gástrica suína a 5% injetado pela mesma via que é aplicado o imunossupressor.<sup>150-151</sup> Passadas 4 horas da inoculação do inóculo, a cirurgia foi realizada para extrair o fígado e proceder à descontaminação do órgão.

Dos sete fígados investigados, o crescimento de *S. aureus* foi observado nas placas de apenas quatro ratos, resultados que se mostram na Figura 31.

Pode-se observar uma grande variabilidade entre os animais, a contaminação do perfusato foi entre 3 e 4 log<sub>10</sub>/mL. Apenas no fígado 1 foi observada a redução completa que se manteve até o final do período de irradiação de 60 min. Neste caso, a resposta apresentou um comportamento semelhante aos experimentos *in vitro*, onde se observa a resposta efetiva sobre as bactérias circulantes no perfusato. Outra amostra (fígado 2) apresentou uma redução no tempo de 5 min e logo um grande aumento para 7 log<sub>10</sub> UFC/mL, com posterior redução para 3 a 3,5 log<sub>10</sub> UFC/mL. O aumento repentino da quantidade de bactérias circulantes pode ser justificado pelas características da perfusão *ex vivo*, onde se pode observar o desprendimento de coágulos sanguíneos o que irá diretamente interferir na variação do número de bactérias no perfusato. Apesar de ter injetado 3 mL de Heparina 3%, via peniana, antes da remoção do fígado, a perfusão e lavagem do órgão não foi uniforme e completamente efetiva.

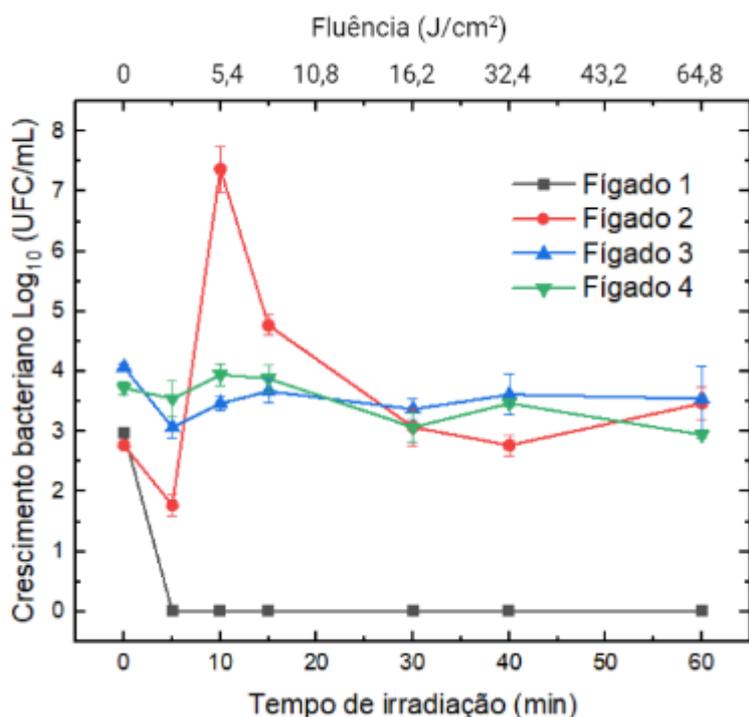


Figura 32 - Efeito da radiação ultravioleta C na inativação de *S. aureus* do perfusato que sai dos fígados contaminados de ratos Wistar quando perfundidos com o Custodiol.

Fonte: Elaborada pela autora

Nos fígados 3 e 4, o comportamento foi semelhante sendo uma concentração de bactérias circulantes entre 3,5 e 4 log<sub>10</sub> UFC/mL, e sem efetiva resposta de inativação por UV-C. Essa resposta pode ser decorrente de a taxa de introdução de bactérias circulantes é similar à taxa de inativação pela irradiação UV-C ou devido à alteração do Custodiol no presente modelo ocasionando uma resposta distinta ao observado nos modelos *in vitro*. Baseado nas análises dos resultados anteriores e pela observação da presença de sangue no perfusato circulante, a hipótese mais provável é a grande atenuação da luz UV-C pela maior presença de componentes de alta absorção nesse intervalo espectral e, portanto, reduzindo a eficiência da inativação.

Os resultados da carga bacteriana residual no macerado dos fígados são apresentados na Figura 33.

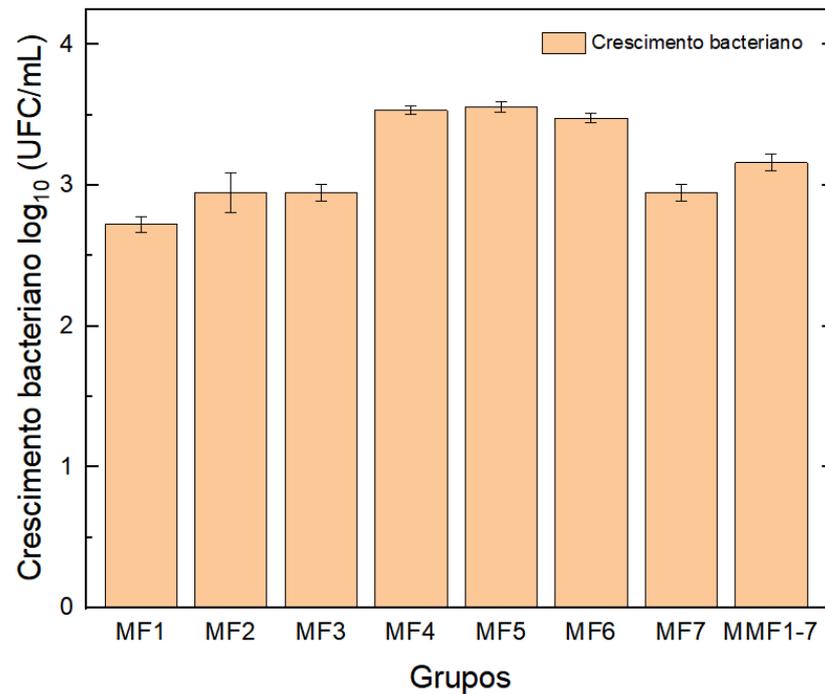


Figura 33 - Sobrevivência de *S. aureus* em fígados de ratos após do processo de inativação com UV-C: MF1, MF2, MF3, MF4, MF5, MF6 e MF7 representam ordens de log<sub>10</sub> UFC/mL recuperadas na maceração dos fígados dos ratos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente, e MMF1-7 a média de ordens de log<sub>10</sub> UFC/mL recuperadas na maceração dos fígados dos ratos 1 a 7.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como pode ser observado, ainda depois do processo de irradiação do perfusato com UV-C, não existe ação efetiva na descontaminação do órgão, sendo que neste modelo de infecção, o fígado apresentava uma contaminação de cerca de 3 log<sub>10</sub> UFC/mL. Similarmente, como observado nos experimentos *in vitro*, a quantidade de bactérias circulantes no perfusato é semelhante à contaminação do foco da infecção e que o processo de perfusão *ex vivo* apresenta uma limitada ação na limpeza do órgão. Com a manutenção desse grau de contaminação, pode-se dizer que o processo de irradiação UV-C durante a perfusão *ex vivo* do fígado não foi efetivo como método de descontaminação.

O gráfico da Figura 34 apresenta a variação dos espectros de transmissão UV-visível da solução de Custodiol e sangue em diferentes proporções.

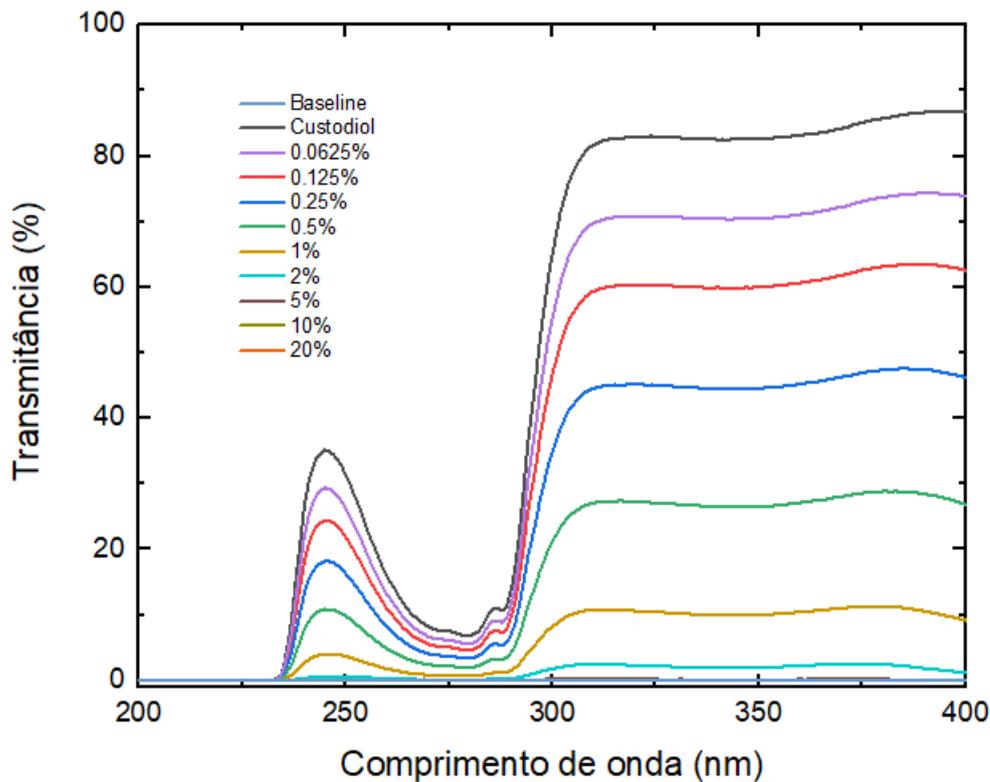


Figura 34 - Espectro da transmitância da luz na solução de Custodiol e sangue entre 200 e 420 nm em função da concentração de sangue.

Fonte: Elaborada pela autora

O sangue possui componentes de características altamente absorvedoras de luz na região do UV-C, de modo que pequenas frações (a partir de 1% de sangue na solução) comprometem mais de 95% da propagação da luz, resultando numa redução de mais de 99% da dose de luz (fluência) entregue.

Para saber o grau de atenuação da luz absorvida, foi calculada a dose entregue por segundo em função da concentração de sangue na solução de Custodiol. Tendo em conta os resultados obtidos no gráfico da Figura 35, quando as concentrações de sangue em Custodiol estão acima do 1%, a transmitância é extremamente reduzida (a transmissão em 254 nm é menor que 5%), como se mostra na Tabela 7. Com isso, pode-se afirmar que a luz não consegue atravessar a solução quando há porções de sangue misturado nela. Portanto, foi impossível conseguir a inativação bacteriana nestas condições, pois a luz apenas consegue chegar até a parte superficial do líquido, sendo impedida de inativar a totalidade das bactérias que circulam pelo tubo de quartzo que está sendo iluminado. Numa concentração tão baixa quanto 1% de sangue no Custodiol, a dose é reduzida em mais de 99% da entregue à superfície do tubo. Este

resultado parece confirmar que, devido à atenuação na entrega de luz, a redução microbiológica obtida foi comprometida, sendo muito inferior ao esperado nas condições *ex vivo*.

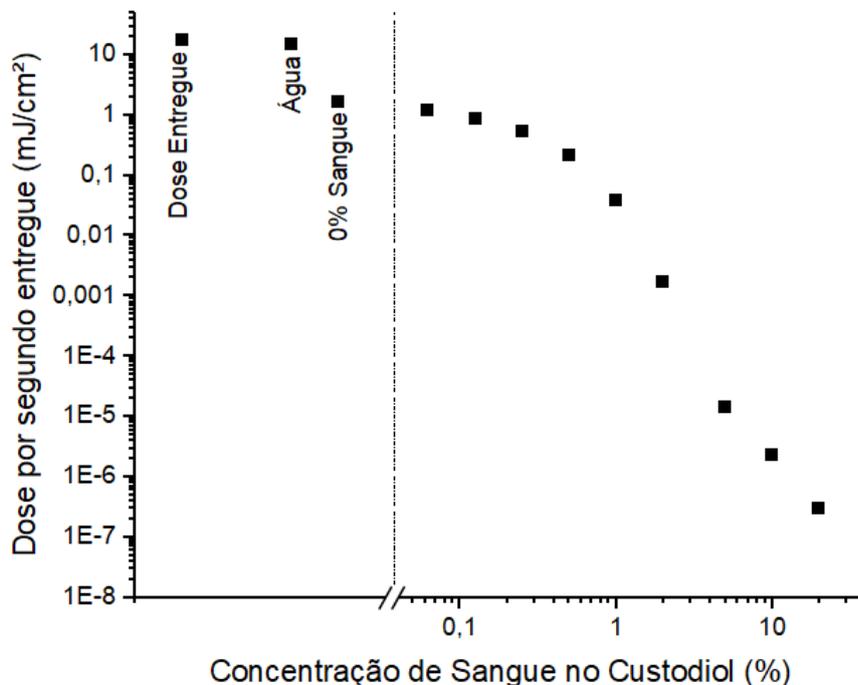


Figura 35 - Percentual de dose entregue, por segundo, na porção central do tubo de quartzo em termos da concentração de sangue no Custodiol. Os valores à direita da linha tracejada vertical estão representados em escala logarítmica da concentração percentual, mostrando quão expressiva é a atenuação da luz UV-C na presença de pequenas porções de sangue no Custodiol. A porção à esquerda da linha tracejada vertical indica o valor de dose entregue pela lâmpada sem obstáculo (0% atenuação), com o tubo preenchido por água (15% atenuação), e no Custodiol sem sangue (aproximadamente 91% atenuação). Estes valores estão fora de escala devido à escala exponencial usada para a concentração.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 7 - Dose de entregue em função da concentração de sangue na solução de Custodiol. Os valores nas linhas amarelas representam os elementos fora de escala na Figura 35.

Condição	Dose / s (mJ/cm²)	Dose / h (J/cm²)	Dose (%)
Entregue	18	64,8	100
Água	15,30773	55,10783	85,04295
0% Sg	1,62321	5,84357	9,01786
0.0625% Sg	1,20785	4,34825	6,71027
0.125% Sg	0,86741	3,12268	4,81895
0.25% Sg	0,52413	1,88689	2,91186
0.5% Sg	0,21801	0,78485	1,21119
1% Sg	0,03912	0,14084	0,21734
2% Sg	0,00173	0,00624	0,00963
5% Sg	1,43387E-5	5,16194E-5	7,96595E-5
10% Sg	2,28784E-6	8,23624E-6	1,27102E-5
20% Sg	2,93787E-7	1,05763E-6	1,63215E-6

Fonte: Elaborada pela autora

Essas análises corroboram com a variabilidade de resposta obtida no estudo *ex vivo* e pela ausência de resposta de inativação bacteriana nos fígados 3 e 4. A partir desses resultados, se demonstra a grande interação negativa do sangue no perfusato, apontando a relevância de uma completa remoção e perfusão homogênea do órgão anterior à irradiação por UV-C, sendo que mesmo 1% em volume de sangue resulta na atenuação de 99% da dose de luz entregue.

#### **10.4 Conclusões Parciais**

O modelo de infecção utilizado para infectar o fígado dos ratos é muito efetivo, conseguindo infectar o órgão com 4 log<sub>10</sub> UFC/mL aproximadamente, ou seja, com a metade da escala logarítmica de UFC injetadas inicialmente nos animais, mostrando-se suficiente para estabelecer o modelo de descontaminação.

O modelo de perfusão *ex vivo* desenvolvido resultou em grande variabilidade da qualidade e homogeneidade da perfusão do órgão, com principal consequência o desprendimento de coágulos sanguíneos e presença de sangue no perfusato. A grande atenuação da luz UV-C na presença de sangue resultou na ausência de resposta de inativação.

A concentração de bactérias circulantes no perfusato foi semelhante ao do foco de infecção (fígado), e o procedimento de perfusão *ex vivo* empregado não apresentou resposta na lavagem e desaderência das bactérias do órgão.

## 11 Considerações finais

O transplante de órgãos é o tratamento de eleição para melhorar a qualidade de vida de pessoas que apresentam doenças crônicas de caráter irreversível em estágio terminal com o intuito de devolver a funcionalidade do órgão e garantir a sobrevivência do receptor. Na atualidade, a demanda de transplantes de órgãos sólidos no mundo tem um crescimento excessivo devido ao aumento de doenças que causam a falência orgânica terminal. A proporção do número de candidatos à espera de um órgão para ser transplantado não é correspondida pelo número de doadores disponíveis, sendo insuficientes para atender as necessidades. Por tanto, a disponibilidade de órgãos é um fator limitante para o transplante, resultando em altas taxas de mortalidade de pacientes na lista de espera.

Os órgãos dos doadores infectados por microrganismos patogênicos são descartados devido ao alto risco de contaminação do receptor e os consequentes problemas associados, diminuindo ainda mais a disponibilidade de órgãos nas redes de transplantes, sendo um fator que complica muito mais o processo.

A radiação ultravioleta-C e a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana são modalidades germicidas estabelecidas para a inativação de microrganismos patogênicos, e quando combinada com a perfusão *ex vivo* do órgão pode se tornar uma alternativa para o tratamento de enxertos contaminados. Por tal motivo neste estudo investigamos a viabilidade do uso da radiação UV-C e a Terapia Fotodinâmica para a descontaminação de órgãos sólidos em modelos *in vitro* e *in vivo* associados à perfusão *ex vivo* do órgão irradiando o líquido circulante para inativar as células bacterianas do meio.

De acordo com os resultados apresentados neste estudo, o uso da radiação ultravioleta-C (254 nm) se mostra viável como alternativa para descontaminação de soluções circulantes durante a perfusão *ex vivo* de enxertos contaminados, pois conseguiu-se a inativação da totalidade das bactérias que ficaram no meio. Diferentes materiais e orientações do fluxo no foco da contaminação foram testados e os resultados obtidos foram semelhantes. Em consequência do fluxo não ser suficiente para a limpeza do órgão, com maior remoção das bactérias, tanto nos testes *in vitro* quanto nos testes *ex vivo*, métodos para o tratamento direto do órgão e/ou para aumentar o desprendimento bacteriano são essenciais para a resposta efetiva.

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com AM (660 nm), que é uma possibilidade a ser investigada para o tratamento do órgão, apresentou uma limitada resposta de inativação mesmo das bactérias circulantes, em contraposição aos resultados do estudo de inativação do vírus de hepatite C no modelo porcino de pulmão. As diferenças são especialmente o tipo de

microrganismo (vírus *versus* bactéria) e o perfusato (Steen e Custodiol).<sup>60</sup> No entanto, os resultados do presente estudo concordam com o observado por Kassab *et al.*, onde a ação fotodinâmica investigada com diversos fotossensibilizadores, inclusive o AM, foi bastante minimizada na presença do surfactante pulmonar.<sup>153</sup> Estudos devem ser realizados para caracterizar a interação das moléculas do AM no Custodiol e como isso está afetando a ação fotodinâmica. A principal hipótese é uma interação forte do AM com biomoléculas componentes do Custodiol, reduzindo altamente a disponibilidade para a interação com as células bacterianas.

No estudo *ex vivo*, o procedimento desenhado não resultou em uma perfusão completa e homogênea, afetando bastante o seguimento do experimento. Não existe atualmente um modelo animal específico para a perfusão *ex vivo* do fígado, assim planejamos um modelo que ainda tem diversas limitações, mas com modificações, especialmente introduzindo a perfusão corpórea global e não somente do fígado, existe um grande potencial de obtermos um modelo resultando em um fígado com menor taxa de coagulação sanguínea e perfusão mais homogênea. No entanto, ainda assim, importantes dados foram obtidos e corroboram com os resultados dos experimentos *in vitro*. A irradiação UV-C tem alta resposta de inativação bacteriana no perfusato, mas sem efeito no foco da infecção. A concentração relativa de bactérias circulantes é semelhante à do tecido infectado. A alta atenuação da luz UV-C em perfusato com sangue resulta na ausência de efeito germicida.

Os principais desafios a serem resolvidos para a continuidade do desenvolvimento dos métodos fotônicos de descontaminação de órgãos sólidos para transplante são:

- 1) Associação de métodos para a perfusão *ex vivo* que permitam um maior desprendimento bacteriano e conseqüente redução da carga bacteriana no órgão.
- 2) Anterior ao uso das tecnologias fotônicas, avaliar a qualidade da perfusão do órgão e quando da alteração da coloração do perfusato, especialmente pelo escurecimento ocasionado pela presença de sangue, o perfusato deve ser trocado por uma solução nova.
- 3) Associação de métodos para o tratamento do órgão para otimizar o tratamento antimicrobiano.
- 4) Investigação da interação das diferentes classes de fotossensibilizadores, com excitação entre 650 e 850 nm, com as diferentes soluções de preservação utilizadas em transplantes de órgãos, e seu conseqüente efeito sobre a ação fotodinâmica antimicrobiana.

## 12 CONCLUSÕES

Nos diferentes modelos *in vitro* conseguiu-se inativar a totalidade de *S. aureus* do líquido circulante reduzindo de 6 a 7 log<sub>10</sub> (UFC/mL) com uma fluência de 64,8 J/cm<sup>2</sup> em até 1 hora de iluminação.

O processo de inativação fotodinâmica bacteriana quando utilizado o AM 0,01% como fotossensibilizador numa solução de Custodiol não apresentou resposta significativa, conseguindo inativar só 1 log<sub>10</sub> (UFC/mL) com uma fluência de 432 J/cm<sup>2</sup> durante 4 horas de iluminação.

A combinação da radiação UV-C e Oxacilina sódica 500mg na inativação bacteriana no modelo *in vitro* usando membranas contaminadas *S. aureus* formando biofilmes não é uma alternativa efetiva nem viável na descontaminação do órgão *ex vivo* a ser transplantado uma vez que em período de tempo empregado na perfusão *ex vivo* de órgãos sólidos, não foi observado nenhum efeito antimicrobiano adicional com o uso do antibiótico.

O estudo *in vivo* de descontaminação de fígados de ratos Wistar com UV-C (254 nm) usando a técnica de perfusão *ex vivo* conseguiu-se inativar apenas 1 log<sub>10</sub> (UFC/mL) da carga bacteriana do líquido perfundido pelo órgão e ausência de efetividade na carga residual no órgão infectado

Com remanescente de 4 a 6 log<sub>10</sub> (UFC/mL) tanto nos materiais quanto nos fígados de ratos após do processo de inativação.

Os resultados apresentados no presente estudo apontam a necessidade de técnicas auxiliares para aumentar a limpeza do órgão durante o processo de perfusão e/ou do tratamento direto do órgão infectado.



## REFERÊNCIAS

- 1 SOARES, L. S. S. *et al.* Transplantes de órgãos sólidos no Brasil: estudo descritivo sobre desigualdades na distribuição e acesso no território brasileiro, 2001-2017. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 29, n. 1, p. e2018512, 2020.
- 2 SCHEUHER, C. A review of organ transplantation. *Critical Care Nursing Quarterly*, v. 39, n. 3 p. 199-206, 2016.
- 3 MCCALMONT, V.; OHLER, L. Cardiac transplantation: candidate identification, evaluation, and management. *Critical Care Nursing Quarterly*, v. 31, n. 3 p. 216-229, 2008.
- 4 HARTERT, M *et al.* Lung transplantation: a treatment option in end-stage lung disease. *Deutsches Ärzteblatt International*, v. 111, n. 7, p. 107-116, 2014.
- 5 TSOCHATZIS, E. A.; BOSCH, J.; BURROUGHS, A. K. Liver cirrhosis. *Lancet*, v. 383, n. 9930, p. 1749-1761, 2014.
- 6 RUDOW, D. L.; GOLDSTEIN, M. J. Critical care management of the liver transplant recipient. *Critical Care Nursing Quarterly*, v. 31, n. 3, p. 232-243, 2008.
- 7 KWONG, A. J.; FIX, O. K. Update on the management of liver transplant patient. *Current Opinion in Gastroenterology*, v. 31, p. 224-232, 2015. DOI:10.1097/MOG.000000000000173.
- 8 NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. Two simple tests to check for kidney disease. Disponível em: <https://www.kidney.org/kidneydisease/twosimpletests>. Updated 2015. Acesso em: 1 dez. 2015.
- 9 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Activities global observatory on Donation & Transplantation. 2019. Disponível em: <http://www.transplant-observatory.org/wp-content/uploads/2021/04/glorep2019.pdf>. Acesso em: 3 Jul. 2021.
- 10 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ORGÃOS. Dimensionamento dos transplantes no Brasil e em cada estado (2013-2020). *Registro Brasileiro de Transplantes*, v. 26, n. 4, p. 1-88, 2020.
- 11 ST PETER, S. D.; IMBER, C. J.; FRIEND, P. J. Liver and kidney preservation by perfusion *Lancet*, v. 359, n. 9306, p. 604-613, 2002.
- 12 LEWIS, A. *et al.* Organ donation in the US and Europe: the supply vs demand imbalance. *Transplantation Reviews*, v. 35, n. 2, p. 100585, 2021.
- 13 COELHO, G. H. F.; BONELLA, A. E. Donación de órganos y tejidos humanos: el trasplante en España y en Brasil. *Revista de Bioética y Derecho*, v. 27, n. 38, p. 419-429, 2019.
- 14 SAIDI, R. F.; KENARI, SK. H. Challenges of organ shortage for transplantation: solutions and opportunities. *International Journal of Organ Transplantation Medicine*, v.5, n. 3, p. 87, 2014.

- 15 BARTOLETTI, M. *et al.* Multidrug-resistant bacterial infections in solid organ transplant candidates and recipients. *Infectious Disease Clinics*, v. 32, n. 3, p. 551-580, 2018.
- 16 WU, X.; HU, X.; HAMBLIN, M. R. Ultraviolet blood irradiation: Is it time to remember “the cure that time forgot”? *Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology*, v.157, p. 89-96, 2016.
- 17 BUONANNO, M. *et al.* 207-nm UV light-a promising tool for safe low-cost reduction of surgical site infections. I: in vitro studies. *PloS ONE*, v. 8, n. 10, p. e76968, 2013.
- 18 FONSECA-NETO, O. C. L. *et al.* El donante marginal: experiencia de um centro de trasplante hepático. *A B C D. Archivos Brasileños de Cirugía Digestiva (São Paulo)*, v. 21, p. 1-5, 2008.
- 19 FREIRE, M. P. *Infecções hospitalares em pacientes submetidos a transplante de fígado: fatores de risco relacionados ao doador.* 2006. 138 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- 20 NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger.* 7th ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2018.
- 21 CORREA, T. Q. *et al.* Effects of ultraviolet light and curcumin-mediated photodynamic inactivation on microbiological food safety: a study in meat and fruit. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 30, p. 101678, 2020. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2020.101678.
- 22 CORRÊA, T. Q. *et al.* Manual operated ultraviolet surface decontamination for healthcare environments. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 35, n. 12, p. 666-671, 2017.
- 23 DELORME, M. M. *et al.* Ultraviolet radiation: an interesting technology to preserve quality and safety of milk and dairy foods. *Trends in Food Science & Technology*, v. 102, p. 146-154, 2020. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.06.001.
- 24 PONNAIYA, B. *et al.* Far-UVC light prevents MRSA infection of superficial wounds in vivo. *PLoS ONE*, v. 13, n. 2, p. e0192053, 2018.
- 25 GROOCOCK, N. H. Disinfection of drinking water by ultraviolet light. *Journal of the Institution of Water Engineers and Scientists*, v. 38, n. 2, p. 163-72, 1984.
- 26 SCHENCK, G. O. Ultraviolet sterilization. In: LORCH, W. (ed.). *Handbook of water purification.* Chichester: Ellis Horwood, 1981. p. 530-595.
- 27 USEPA. Ultraviolet light disinfection technology in drinking water application – an overview. EPA 811-R-96-002 Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Ground Water and Drinking Water, 1996.
- 28 WÜRTELE, M. A. *et al.* Application of GaN-based ultraviolet-C light emitting diodes–UV LEDs–for water disinfection. *Water Research*, v. 45, n.3, p. 1481-1489, 2011.

- 29 BLATCHLEY III, E. R. *et al.* Validation of large-scale, monochromatic UV disinfection systems for drinking water using dyed microspheres. *Water Research*, v. 42, n.3, p. 677-688, 2008.
- 30 CANTWELL, R. E. *et al.* Inactivation of indigenous coliform bacteria in unfiltered surface water by ultraviolet light. *Water Research*, v. 42, n.10-11, p. 2729-2735, 2008.
- 31 BUTKUS, M. A. *et al.* Feasibility of the silver-UV process for drinking water disinfection. *Water Research*, v. 39, n. 20, p. 4925-4932, 2005.
- 32 GRECZ, N. *et al.* The action of radiation on bacteria and viruses. preservation of food by ionizing radiation. New York: CRC Press, 2018. 167-218.
- 33 FREDERICKS, I. N. *et al.* Efficacy of ultraviolet radiation as an alternative technology to inactivate microorganisms in grape juices and wines. *Food Microbiology*, v. 28, n. 3, p. 510-517, 2011.
- 34 GABRIEL, A. A. *et al.* Decontamination of dried whole black peppercorns using ultraviolet-c irradiation. *Food Microbiology*, v. 88, n. S8, p. 103401, 2020.
- 35 FONSECA, J. M. *et al.* Effect of ultraviolet-C light on quality and microbial population of fresh-cut watermelon. *Postharvest Biology and Technology*, v. 40, n. 3, p. 256-261, 2006.
- 36 WALKLING-RIBEIRO, M. *et al.* Reduction of *Staphylococcus aureus* and quality changes in apple juice processed by ultraviolet irradiation, pre-heating and pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, v. 89, n. 3, p. 267-273, 2008.
- 37 BEGUM, M.; HOCKING, A. D.; MISKELLY, D. I. Inactivation of food spoilage fungi by ultra violet (UVC) irradiation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 129, n.1, p. 74-77, 2009.
- 38 FAN, X. *et al.* Application of ultraviolet C technology for surface decontamination of fresh produce. *Trends in Food Science & Technology*, v. 70, p. 9-19, 2017.
- 39 ROSSI, M. C. A. *et al.* Physiotherapy elastic band disinfection by UV-C irradiation in an intensive care unit. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 34, p. 102262, 2021.
- 40 LINDBLAD, M. *et al.* Ultraviolet-C decontamination of a hospital room: amount of UV light needed. *Burns*, v. 46, n. 4, p. 842-849, 2020.
- 41 MATHEW, J. I. *et al.* Evaluation of an enclosed ultraviolet-C radiation device for decontamination of mobile handheld devices. *American Journal of Infection Control*, v. 44, n. 6, p. 724-726, 2016.
- 42 ZHU, T. C. *et al.* The role of photodynamic therapy (PDT) physics. *Medical Physics Part1*, v. 35, n.7, p. 3127-3136, 2008.
- 43 VAN STRATEN, D. *et al.* Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. *Cancers*, v. 9, n. 2, p. 192017.

- 44 ALLISON, R. R. *et al.* Future of oncologic photodynamic therapy. *Future Oncology*, v. 6, n.6, p. 929-940, 2010.
- 45 VOLLET-FILHO, J. D.; BORGES, A. G. C.; INADA, N. M.; BAGNATO, V. S.; KURACHI, C. Using ultraviolet light for reduction of *Staphylococcus aureus* in preservation solutions for transplantation - an in vitro study. 2019 SBFoton International Optics and Photonics Conference (SBFoton IOPC), 2019, p. 1-3, DOI: 10.1109/SBFoton-IOPC.2019.8910228.
- 46 ALVES, S. R. *et al.* Preservação de fígados humanos com perfusão ex-vivo: uma visão do estado da arte. *Brazilian Journal of Transplantation*, v. 20, n.1, p. 20-24, 2017.
- 47 YADAV, S. K. *et al.* Ex-vivo organ perfusion technique for deceased donor liver transplantation (DDLT). *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, v. 9, n.3, p. 439-440, 2019.
- 48 MEIRELLES JÚNIOR, R. F. *et al.* Transplante de fígado: história, resultados e perspectivas. *Einstein (São Paulo)*, v. 13, n. 1, p. 149-152, 2015.
- 49 RASTOGI, A. *et al.* "Ex-vivo organ perfusion technique for deceased donor liver transplantation (DDLT). *Transplantation*, v. 101. n. 5., 2017.
- 50 CARDOSO, P. F. G. As novas perspectivas do transplante de pulmão: da preservação convencional à perfusão pulmonar ex vivo com condicionamento pulmonar. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 35, n. 11, p. 1057-1059, 2009.
- 51 ABDALLA, L. G. *et al.* A experiência brasileira na perfusão pulmonar ex vivo. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 42, n. 2, p. 95-98, 2016.
- 52 ABDALLA, L. G. *et al.* Erratum: avaliação e condicionamento de pulmões doados para transplante por meio da perfusão pulmonar ex vivo. *Einstein*, v. 14, n.4, 2019.
- 53 KATHS, J. M. *et al.* Continuous normothermic ex vivo kidney perfusion improves graft function in donation after circulatory death pig kidney transplantation. *Transplantation*, v. 101, n.4, p. 754, 2017.
- 54 LEITE, R. R. A. *et al.* Máquina de perfusão versus armazenamento estático na preservação renal de doadores com morte encefálica: revisão sistemática e metanálise. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 46, n. 2, 2019.
- 55 MOSER, M. A. J. *et al.* Early experience with hypothermic machine perfusion of living donor kidneys—a retrospective study. *Transplant International*, v. 30, n. 7, p. 706-712, 2017.
- 56 SAVOYE, E. *et al.* Evaluation of outcomes in renal transplantation with hypothermic machine perfusion for the preservation of kidneys from expanded criteria donors. *Clinical Transplantation*, v. 33, n. 5, p. e13536, 2019.
- 57 KARIMIAN, N. *et al.* Subnormothermic machine perfusion of steatotic livers results in increased energy charge at the cost of anti-oxidant capacity compared to normothermic perfusion. *Metabolites*, v. 9, n.11, p. 246, 2019.

- 58 O'NEILL, S. *et al.* Novel organ perfusion and preservation strategies in transplantation—where are we going in the United Kingdom?. *Transplantation*, v. 104, n.9, p. 1813-1824, 2020.
- 59 RIJKSE, E. *et al.* Machine perfusion in abdominal organ transplantation: current use in the Netherlands. *World Journal of Transplantation*, v. 10, n.1, p. 15, 2020.
- 60 GALASSO, M. *et al.* Inactivating hepatitis C virus in donor lungs using light therapies during normothermic ex vivo lung perfusion. *Nature Communications*, v. 10, n.1, p. 1-12, 2019.
- 61 CYPEL, M. *et al.* Prevention of viral transmission during lung transplantation with hepatitis C-viraemic donors: an open-label, single-centre, pilot trial. *Lancet Respiratory Medicine*, v. 8, n. 2, p. 192-201, 2020.
- 62 GOENAGA-MAFUD, L. C. *et al.* Kidney decontamination during perfusion for transplantation procedure: in vitro and ex vivo viability analysis. *Journal of Biophotonics*, v. 15, n. 5, p. e202100319, 2022.
- 63 GOMES, L. C. M. *Uso da terapia laser fotodinâmica associada ao azul de metileno (PDT-MB) em células tumorais de próstata humanas (PC3)*. 2021. 57f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2021.
- 64 LONGO, J. P. F.; LOZZI, S. P.; AZEVEDO, C. B. Câncer bucal e a terapia fotodinâmica como modalidade terapêutica. *Revista Gaúcha de Odontologia*, v. 59, Supl. 1, p. 51-57, 2011.
- 65 TEODORO, P. S.; FERNANDES, H. V. S. O uso da terapia fotodinâmica como método alternativo de tratamento da candidíase oral. *Revista Arquivos Científicos (IMMES)*, v. 3, n.1, p. 14-23, 2020.
- 66 IZOTON, C. F. G.; ISRAEL, M. S. Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy on the treatment of oral candidiasis in people living with HIV/AIDS/Eficácia antimicrobiana da terapia fotodinâmica no tratamento da candidíase oral em pessoas vivendo com HIV/AIDS. *Revista de Pesquisa Cuidado é Fundamental Online*, v. 12, p. 505-509, 2021. DOI: 10.9789/2175-5361.rpcfo.v12.8598.
- 67 CARNEIRO, V. S. M. *Eficácia da terapia fotodinâmica na cicatrização de feridas cutâneas potencialmente contaminadas em ratos*. 2012. 93 f. Dissertação (Epidemiologia e Promoção de Saúde) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012.
- 68 BRANDÃO, M. G. S. A. *et al.* Terapia fotodinâmica no tratamento de feridas infectadas nos pés de pessoas com diabetes mellitus: síntese de boas evidências: photodynamic therapy in the treatment of infected wounds on the feet of people with diabetes mellitus. *Revista Enfermagem Atual In Derme*, v. 92, n. 30, 2020.
- 69 SILVA, A. P. *Novas estratégias para o diagnóstico de onicomicose e tratamento por terapia fotodinâmica*. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.
- 70 MURIEL, P. The liver: general aspects and epidemiology. *In: MURIEL, P. (ed.). Liver pathophysiology*. New York: Academic Press, 2017. p. 3-22.

71 TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. *Princípios de anatomia e fisiologia*. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

72 BUSUTTIL, R. W.; KLINTMALM, G. B. *Transplantation of the liver*. Berlin: Elsevier Health Sciences, 2014.

73 DOOLEY, J. S. *et al. Sherlock's diseases of the liver and biliary system*. New York: John Wiley & Sons, 2018.

74 GUYTON, A.; HALL, J. E. *Tratado de fisiologia médica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

75 SOBOTTA, J. *Atlas de anatomía humana*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1992.

76 GUARRERA, J. V. *et al.* Hypothermic machine preservation in human liver transplantation: the first clinical series. *American Journal of Transplantation*, v. 10, n. 2, p. 372-381, 2010.

77 OP DEN DRIES, S. *et al.* Ex vivo normothermic machine perfusion and viability testing of discarded human donor livers. *American Journal of Transplantation*, v. 13, n. 5, p. 1327-1335, 2013.

78 BRUINSMA, B. G. *et al.* Metabolic profiling during ex vivo machine perfusion of the human liver. *Scientific Reports*, v. 6, n.1, p. 1-13, 2016.

79 GUARRERA, J. V. *et al.* Hypothermic machine preservation facilitates successful transplantation of “orphan” extended criteria donor livers. *American Journal of Transplantation*, v. 15, n.1, p. 161-169, 2015.

80 GUARRERA, J. V. *et al.* Hypothermic machine preservation attenuates ischemia/reperfusion markers after liver transplantation: preliminary results. *Journal of Surgical Research*, v. 167, n.2, p. e365-e373, 2011.

81 MONBALIU, D. *et al.* Preserving the morphology and evaluating the quality of liver grafts by hypothermic machine perfusion: a proof-of-concept study using discarded human livers. *Liver transplantation*, v. 18, n.12, p. 1495-1507, 2012.

82 BRUINSMA, B. G. *et al.* Functional human liver preservation and recovery by Means of Subnormothermic machine perfusion. *Journal of Visualized Experiments*, n. 98, p. 52777, 2015. DOI:10.3791/52777.

83 CERESA, C. D. L. *et al.* Transient cold storage prior to normothermic liver perfusion may facilitate adoption of a novel technology. *Liver Transplantation*, v. 25, n.10, p. 1503-1513, 2019.

84 BOTEON, Y. L. *et al.* Machine perfusion of the liver: which is the best technique to mitigate ischaemia-reperfusion injury? *World Journal of Transplantation*, v. 9, n.1, p. 14, 2019.

85 RAVIKUMAR, R.; LEUVENINK, H.; FRIEND, P. J. Normothermic liver preservation: a new paradigm? *Transplant International*, v. 28, n.6, p. 690-699, 2015.

86 BOTEON, Y. L.; AFFORD, S. C.; MERGENTAL, H. Pushing the limits: machine preservation of the liver as a tool to recondition high-risk grafts. *Current Transplantation Reports*, v. 5, n. 2, p. 113-120, 2018.

87 BOTEON, Y. L.; BOTEON A. P. C. S. Perspectivas para a máquina de perfusão hepática ex situ no Brasil. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 47, 2020. DOI: 10.1590/0100-6991e-202026.

88 BOTEON, Y. L. *et al.* Combined hypothermic and normothermic machine perfusion improves functional recovery of extended criteria donor livers. *Liver Transplantation*, v. 24, n.12, p. 1699-1715, 2018.

89 DE VRIES, Y. *et al.* Pretransplant sequential hypo-and normothermic machine perfusion of suboptimal livers donated after circulatory death using a hemoglobin-based oxygen carrier perfusion solution. *American Journal of Transplantation*, v. 19, n.4, p. 1202-1211, 2019.

90 EDELMAN, J. J. B. *et al.* Custodiol for myocardial protection and preservation: a systematic review. *Annals of Cardiothoracic Surgery*, v. 2, n.6, p. 717, 2013.

91 KAASCH, A. J. *et al.* Staphylococcus aureus bloodstream infection: a pooled analysis of five prospective, observational studies. *Journal of Infection*, v.68, n.3, p 242-251, 2014.

92 LAUPLAND, K. B. *et al.* The changing epidemiology of Staphylococcus aureus bloodstream infection: a multinational population-based surveillance study. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 19, n. 5, p. 465-471, 2013.

93 VOGEL, M. *et al.* Infectious disease consultation for Staphylococcus aureus bacteremia—a systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*, v. 72, n.1, p 19-28, 2016.

94 TURNER, R. B. *et al.* Impact of infectious diseases consultation on clinical outcomes of patients with Staphylococcus aureus bacteremia in a community health system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 60, n.10, p. 5682-5687, 2016.

95 ASGEIRSSON, H.; THALME, A.; WEILAND, O. Staphylococcus aureus bacteraemia and endocarditis—epidemiology and outcome: a review. *Infectious Diseases*, v. 50, n.3, p. 175-192, 2018.

96 RHEE, Y. *et al.* Evolving epidemiology of Staphylococcus aureus bacteremia. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, v. 36, n.12, p. 1417-1422, 2015.

97 TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. *Microbiologia*. 12. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016.

98 LIMA, M. F. P. *et al.* Staphylococcus aureus e as infecções hospitalares—revisão de literatura. *Uningá Review Journal*, v. 21, n.1, p.32-39, 2015.

99 MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M A. *Microbiologia médica*. 6th ed. Berlin: Elsevier, 2010.

100 SANTOS, A. L. *et al.* Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.43, n. 6, p. 413-423, 2007.

101 LOWY, F. D. Staphylococcus aureus infections. *New England journal of medicine*, v. 339, n.8, p. 520-532, 1998.

102 POLLITT, E. J. G. *et al.* Staphylococcus aureus infection dynamics. *PLoS Pathogens*, v. 14, n.6, p. e1007112, 2018

103 TAYLOR, T. A.; UNAKAL, C. G. *Staphylococcus aureus*. StatPearls, 2021.

104 RASIGADE, J.-P.; VANDENESCH, F. Staphylococcus aureus: a pathogen with still unresolved issues. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 21, p. 510-514, 2014.

105 LOWY, F. D. Staphylococcus aureus infections. *New England Journal of Medicine*, v. 339, n.8, p. 520-532, 1998.

104 DAVID, M. Z.; DAUM, R. S. Treatment of Staphylococcus aureus infections. *In: BAGNOLI, F.; RAPPUOLI, R.; GRANDI, G. (ed.). Staphylococcus aureus*. Cham: Springer, 2017. p. 325-383.

106 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Outbreaks of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus skin infections--Los Angeles County, California, 2002-2003. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 52, n. 5, p. 88, 2003.

107 YANG, E. S. *et al.* Body site colonization in patients with community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus and other types of S. aureus skin infections. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 16, n. 5, p. 425-431, 2010.

108 BOUCHER, H. W.; COREY, G. R. Epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, Suppl. 5, p. S344-S349, 2008.

109 KLEIN, E. Y. *et al.* The changing epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the United States: a national observational study. *American Journal of Epidemiology*, v. 177, n.7, p. 666-674, 2013.

110 LOPES, L. G. *et al.* Efeitos biológicos da radiação ultravioleta e seu papel na carcinogênese de pele: uma revisão. *Revista Eletrônica da Faculdade de Ceres*, v. 7, n.1, p. 117-146, 2018.

111 WU, XIMING, XIAOQING HU, AND MICHAEL R. HAMBLIN. Ultraviolet blood irradiation: Is it time to remember “the cure that time forgot”? *Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology*, v.157, p. 89-96, 2016.

- 112 BORETTI, A.; BANIK, B.; CASTELLETTO, S. Use of ultraviolet blood irradiation against viral infections. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, v. 60, n. 2, p. 259-270, 2021.
- 113 HEßLING, M. *et al.* Ultraviolet irradiation doses for coronavirus inactivation—review and analysis of coronavirus photoinactivation studies. *GMS Hygiene and Infection Control*, v. 15, 2020. DOI: 10.3205/dgkh000343
- 114 CORRÊA, T. Q. *Técnicas ópticas para o controle microbiológico de sangue*. 2017. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.
- 115 NELSON, D. L.; COX, M. M. *Leninger: princípios de bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 2002. 975p.
- 116 MAHMOUD, H.; KADER, A. Photodynamic therapy. *In: ABDEL-KADER, M. H. (ed.). From theory to application*. Heidelberg: Springer, 2014. p. 6-7.
- 117 PATRICE, THIERRY, ED. *Photodynamic therapy*. vol. 2. Royal Society of Chemistry, 2003.
- 118 ALLISON, RON R., AND KEYVAN MOGHISSI. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. *Clinical Endoscopy*, v. 46, p. 24, 2013.
- 119 RAAB, O. Ueber die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorien. *Zeitschrift für Biologie*, v. 39, p. 524-546, 1900.
- 120 PRIME, J. *Des accidents toxique produits par l'éosinate de sodium*. 1900.
- 121 ACKROYD, ROGER. *et al.* The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.
- 122 KORZYBSKI, T.; KOWSZYK-GINDIFER, Z.; KURYLOWICZ, W. *Antibiotics: origin, nature and properties*. Berlin: Elsevier, 2013.
- 123 TAVARES, W. Pequena história sobre os antimicrobianos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n. 3, p. 153-158, 1985.
- 124 MAISCH, T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 14, n. 8, p. 1518-1526, 2015.
- 125 MIRETTI, M. *et al.* Photodynamic inactivation of multiresistant bacteria (KPC) using zinc (II) phthalocyanines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 27, n.18, p. 4341-4344, 2017.
- 126 MAISCH, T. *et al.* Photodynamic inactivation of multi-resistant bacteria (PIB)—a new approach to treat superficial infections in the 21st century. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, v. 9, n.5, p. 360-366, 2011.
- 127 BAGNATO, V. S. *Terapia fotodinâmica dermatológica: programa TFD Brasil*. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2015.

128 RAPACKA-ZDOŃCZYK, A. *et al.* Factors determining the susceptibility of bacteria to antibacterial photodynamic inactivation. *Frontiers in Medicine*, v. 8, p. 617, 2021.

129 HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Current Opinion in Microbiology*, v. 33, p. 67-73, 2016.

130 VINAGREIRO, C. S. *et al.* Antibacterial photodynamic inactivation of antibiotic-resistant bacteria and biofilms with nanomolar photosensitizer concentrations. *ACS Infectious Diseases*, v. 6, n. 6, p. 1517-1526, 2020.

131 WAINWRIGHT, M. *et al.* Photoantimicrobials—are we afraid of the light? *Lancet Infectious Diseases*, v. 17, n. 2, p. e49-e55, 2017.

132 HUANG, L. *et al.* Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 44, n.6, p. 490-499, 2012.

133 KASHEF, N.; MICHAEL, R. H. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? *Drug Resistance Updates*, v. 31, p. 31-42, 2017.

134 MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, v. 5, n. 2, p. 105-129, 2001.

135 WILSON, B. C.; PATTERSON, M. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Physics in Medicine & Biology*, v. 53, n. 9, p. R61, 2008.

136 PRATAVIEIRA, S. *et al.* Phototransformation of hematoporphyrin in aqueous solution: anomalous behavior at low oxygen concentration. *Laser Physics*, v. 19, n. 6, p. 1263-1271, 2009.

137 BRASIL. Ministério da Saúde. *Sistema nacional de transplantes*. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/saes/snt>. Acesso em: 25 de jul. de 2022.

138 SCHLEGEL, A.; KRON, P.; DUTKOWSKI, P. Hypothermic machine perfusion in liver transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation*, v. 21, n.3, p. 308-314, 2016.

139 SCHLEGEL, A.; MULLER, X.; DUTKOWSKI, P. Hypothermic liver perfusion. *Current Opinion in Organ Transplantation*, v. 22, n.6, p. 563-570, 2017.

140 SCHLEGEL, A.; MULLER, X.; DUTKOWSKI, P. Machine perfusion strategies in liver transplantation. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, v. 8, n. 5, p. 490, 2019.

141 OLIVEIRA, B. P. *Desenvolvimento de um sistema para inativação microbiológica em vegetais frescos por ação física através de líquidos circulantes*. 2021. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

142 BINTSIS, T.; LITOPOULOU - TZANETAKI, E.; ROBINSON, R. K. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry—a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 80, n. 6, p. 637-645, 2000.

- 143 LÓPEZ-DÍAZ, A. S.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Radiación ultravioleta en jugos de frutas: fundamentos y aplicaciones. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, v. 6, n. 2, p. 79-93, 2012.
- 144 PANTOJA-ESPINOZA, J. C. *et al.* Eficiencias comparativas de inactivación de bacterias coliformes en efluentes municipales por fotólisis (UV) y por fotocátalisis (UV/TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub>). caso: depuradora de águas de Salamanca, España. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, v. 14, n.1, p. 119-135, 2015 119-135.
- 145 AMASINO, A. J. *et al.* Aplicación de luz UVC para esterilizar soluciones parenterales./application of UVC light to sterilize parenteral solutions. *Ciencia Veterinaria*, v. 20, n. 2, p. 13-26, 2018.
- 146 AL-SNAFI, A. E. Constituents and pharmacology of *Luffa cylindrica* - a review. *IOSR Journal of Pharmacy*, v. 9, n. 9, p. 68-79, 2019.
- 147 VILLA JIMÉNEZ, O. M. ALONSO GALBÁN, P.; PEÑA VILLA, M. J. Formulario Nacional de Medicamentos de Cuba: aplicación para Android. Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas, 2016.
- 148 BRUNTON, L. L.; HILAL-DANDAN, R.; KNOLLMANN, B. C. *As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman*. 13. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2018.
- 149 NCCLS. *Metodologia dos testes a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: norma aprovada-sexta edição*. 2015. Disponível em: [https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi\\_opasm7\\_a6.pdf](https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_opasm7_a6.pdf). Acesso em: 23 jan. 2020.
- 150 MAJEWSKI, M.; JORGE, A. O. C.; JUNQUEIRA, J. C. Efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana em leveduras do gênero *Candida*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 35, n. 4, 2014.
- 151 TARDIVO, J. P. *et al.* Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 2, n. 3, p. 175-191, 2005.
- 152 HORI, L. Y. *Susceptibilidade do Staphylococcus aureus à terapia fotodinâmica (PDT)*. 2013. 61f. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmacêutica Bioquímica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.
- 153 KASSAB, G. *et al.* Lung surfactant negatively affects the photodynamic inactivation of bacteria—in vitro and molecular dynamic simulation analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 119, n. 25, p. e2123564119, 2022.
- 154 TSUJI, M. *et al.* In vivo antibacterial activity of S-3578, a new broad spectrum cephalosporin: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* experimental infection models. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, n. 8, p. 2507-2512, 2003.

155 VIVEKANANDAN, L. *et al.* Ameliorative effect of silymarin against linezolid-induced hepatotoxicity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infected Wistar rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 108, p. 1303-1312, 2018.

156 FISH, R. *et al.* *Anesthesia and analgesia in laboratory animals*. New York: Academic Press, 2011.

157 OLDANI, G. *et al.* Orthotopic liver transplantation in rats. *Journal of Visualized Experiments*, v. 65, p. e4143, 2012.

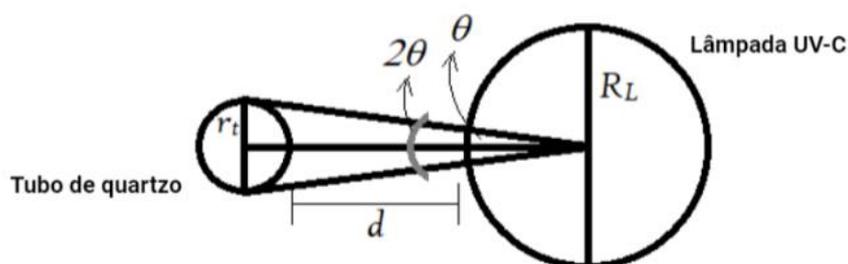
158 KOBAYASHI, E.; KAMADA, N.; GOTO, S. Protocol for the technique of orthotopic liver transplantation in the rat. *Microsurgery*, v.14, n. 8, p. 541-546, 1993.

159 CLOSE, B. *et al.* Recommendations for euthanasia of experimental animals: part 2. *Laboratory Animals*, v. 31, n.1, p. 1-32, 1997.

160 NIELSEN, C. K. *et al.* Effects of Tween 80 on growth and biofilm formation in laboratory media. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 1878, 2016.

## ANEXO A - Calibração do sistema de irradiação e dosimetria UV- C

O cálculo da fluência entregue é relevante para se definir protocolos efetivos de inativação microbiana, tanto considerando a geometria de irradiação, assim como o fluxo utilizado durante a perfusão. Para calcular a fluência entregue ao fluido circulante no sistema de perfusão, é necessário levar em conta vários parâmetros, como por exemplo: o volume total circulado pelo sistema ( $V_T$ ), o tempo de irradiação ( $t$ ), a irradiação de uma lâmpada UV-C ( $\Phi_{UV}$ ), o raio do tubo de quartzo ( $r_t$ ), o raio da lâmpada ( $R_L$ ), o comprimento da lâmpada UV-C ( $C_L$ ), a distância entre a lâmpada e o tubo ( $d$ ), o ângulo formado entre o eixo que liga os centros dos cilindros e o limite de irradiação atingido pela luz que sai da lâmpada ( $\theta$ ), e o ângulo equivalente ao da parte da luz que irradia o cilindro ( $2\theta$ ). Na Figura 36 se representa a disposição da cada lâmpada em relação à irradiação do tubo de quartzo.



**Figura 36** - Representação da emissão individual da lâmpada em relação ao tubo de quartzo. O círculo maior representa cada lâmpada, enquanto o menor representa o tubo de quartzo e seu posicionamento em relação à lâmpada. As linhas azuis descrevem o ângulo  $2\theta$  que descreve a parte da luz emitida que irradia o tubo  $R_L$  e  $r_t$  representam o raio da lâmpada e do tubo respectivamente, e  $d$  a distância entre eles.

Fonte: Elaborada pela autora.

A fluência média entregue ao volume de fluido circulante no sistema de perfusão é definida como a quantidade de energia  $E$  entregue ao volume total  $V_T$  do fluido circulante, por isso definimos uma dose de luz volumétrica ou fluência ( $Dv$ ), em  $J/cm^3$  (Equação 1).

$$Dv = \frac{E}{V_T} \quad \left[ \frac{J}{cm^3} \right] \quad (1)$$

A partir da definição da fluência, que é definida como a energia de luz  $E$  fornecida através da área  $A$  de uma seção transversal assumida como sendo a superfície do material irradiado, é possível estabelecer que a fluência fornecida à superfície  $D_s$  é dada pela irradiação  $\phi_{UV}$  da fonte de luz UV e o tempo de irradiação  $t$ , de acordo com a Equação 2.

$$D_s = \frac{E}{A} = \phi_{UV} t \quad \left[ \frac{J}{cm^2} \right] \quad (2)$$

Ao associar as Equações (1) e (2), e levando em conta que a potência óptica emitida pelas lâmpadas é constante, temos:

$$E_{system} = E = D_s A = D_v V_T \quad (3)$$

Portanto, a fluência de superfície entregue será a fluência entregue do líquido circulante vezes o volume total do líquido dividido pela área de superfície, como mostra a equação 4.

$$D_s = \frac{D_v V_T}{A} \quad (4)$$

A fluência entregue por volume  $D_v$  pode assim ser definida como mostrado na Equação 5, substituindo a Equação 2 pela Equação 4:

$$D_v = \left( \frac{\phi_{UV} A t}{V_T} \right) \quad (5)$$

Assumindo uma área irradiada  $A = 2\theta R_L C_L$  na Equação 5, a fluência média do volume fornecido ao sistema é dada pela Equação 6. Nessa expressão, representa o comprimento da lâmpada, de modo que  $A$  pode representar a porção da superfície da lâmpada que é irradiada.

$$D_v = \frac{\phi_{UV} 2\theta R_L C_L t}{V_T} \quad (6)$$

Para estimar  $\theta$ , devemos considerar a disposição geométrica das lâmpadas e do tubo de quartzo. Um  $V_T=100$  mL de líquido foi circulado pelo sistema, que foi irradiado por 4 horas com 4 lâmpadas com uma irradiação de  $\phi_{UV}=4,5$  mW/cm<sup>2</sup> cada. Sabendo que os raios do tubo de quartzo e da lâmpada são 4 e 8 mm, respectivamente, a distância entre a lâmpada e o tubo é  $d = 1$  mm, e o comprimento  $C_L$  da lâmpada UVC é 110 mm, é possível calcular  $\theta$  usando as equações 7 e 8.

$$\theta = \arctg \left( \frac{r_t}{r_t + d + R_L} \right) \quad (7)$$

$$\theta = 17,44^\circ \sim \frac{\pi}{10} \quad (8)$$

Assumindo uma irradiação constante de  $\phi_{UV} = 4,5 \text{ mW/cm}^2$  para cada lâmpada UVC, e que existem 4 lâmpadas no sistema, a irradiância total seria  $\phi_{UV} = 18 \text{ mW/cm}^2$ ; o cálculo da dose média entregue ao volume total que circula no sistema será dado aproximadamente por:

$$D_V = \frac{0,0945648 * t}{V_T} \quad \left[ \frac{J}{\text{cm}^3} \right] \quad (9)$$

Finalmente, a dose média de superfície entregue foi calculada pela equação 4, substituindo o valor de  $D_V$  calculado na equação 9 para cada vez.

## ANEXO B



**IFSC** UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO  
Instituto de Física de São Carlos

**COMISSÃO DE ÉTICA  
NO USO DE ANIMAIS**

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de técnicas ópticas para descontaminação de órgãos para transplante em modelo animal", protocolada sob o CEUA nº 8317070319, sob a responsabilidade de **José Dirceu Vollet Filho e equipe; Yordania Matos Gámez; Natalia Mayumi Inada; Cristina Kurachi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo (CEUA/IFSC) na reunião de 02/04/2019.

We certify that the proposal "Evaluation of optical techniques for decontamination of organs for transplantation in animal model", utilizing 60 Heterogenics rats (60 males), protocol number CEUA 8317070319, under the responsibility of **José Dirceu Vollet Filho and team; Yordania Matos Gámez; Natalia Mayumi Inada; Cristina Kurachi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Physics Institute of São Carlos - São Paulo University (CEUA/IFSC) in the meeting of 04/02/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [04/2019](#) a [03/2022](#) Área: [Grupo de Óptica / Fcm](#)

Origem: [Não aplicável biotério](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [8 a 12 semanas](#) N: [60](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [300 a 400 g](#)

Local do experimento: Sala de Experimentação Animal do Grupo de Óptica

São Carlos, 02 de abril de 2019

Prof. Dr. Fernando Fernandes Paiva  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo