

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE – PPGSMA
MESTRADO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE

**CONTROLE FOTOBIOLOGICO POR CLOROFILINA EM CEPAS
DE *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9080), *Staphylococcus aureus*
(ATCC 6359) E *Klebsiella pneumoniae* (KPC LBM 83)**

LUAN GESSER RODRIGUES

ORIENTADOR: PROF. DR. GILMAR SIDNEI ERZINGER

COORIENTADOR: PROF. DR. SEBASTIAN MICHAEL STRAUCH

JOINVILLE – SC

2023

LUAN GESSER RODRIGUES

CONTROLE FOTOBIOLOGICO POR CLOROFILINA EM CEPAS DE
Saccharomyces cerevisiae (ATCC 9080), *Staphylococcus aureus* (ATCC
6359) E *Klebsiella pneumoniae* (KPC LBM 83)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, Mestrado em Saúde e Meio Ambiente, Linha de pesquisa Qualidade Ambiental e Saúde da Universidade da Região de Joinville (Univille), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, sob orientação da Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger e coorientação do Prof. Dr. Sebastian Michael Strauch.

JOINVILLE – SC

2023

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

R696c Rodrigues, Luan Gesser
Controle fotobiológico por clorofilina em cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9080), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6359) e *Klebsiella pneumoniae* (KPC LBM 83) / Luan Gesser Rodrigues; orientador Dr. Gilmar Sidnei Erzinger; coorientador Dr. Sebastian Michael Strauch. – Joinville: UNIVILLE, 2023.

45 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. *Staphylococcus aureus*. 2. *Klebsiella pneumoniae*. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. 4. Fotoquimioterapia. I. Erzinger, Gilmar Sidnei. II. Strauch, Sebastian Michael (orient.). III. Título.

CDD 616.014

Termo de Aprovação

“Controle Fotobiológico por Clorofilina em Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9080) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6359) e *Klebsiella pneumoniae* (KPC LBM 83)”

por

Luan Gesser Rodrigues

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger
Orientador (UNIVILLE)

Prof. Dr. Sebastian Michael Strauch
Coorientador (UNIVILLE)

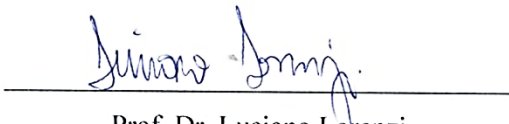
Prof. Dr. Adriano Weidner Cacciatori Marenzi
(UNIVALI)

Profª. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
(UNIVILLE)

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.



Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger
Orientador (UNIVILLE)



Prof. Dr. Luciano Lorenzi
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Joinville, 17 de março de 2023

RESUMO

As bactérias *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* podem prejudicar a qualidade de vida dos seres humanos, em especial, aos que possuem alguma debilitação imunológica prévia. O controle delas é dificultado pelas características patogênicas que apresentam e especialmente pela capacidade de resistência aos antibióticos atuais. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que é amplamente utilizada na indústria cervejeira, pode ocasionar de forma indireta danos ao meio ambiente, como a utilização de diversos produtos tóxicos para que seja realizada a limpeza da fábrica, bem como, necessita de uma grande demanda de água para que ocorra o processo de higienização. O presente estudo visa utilizar clorofilina, um derivativo hidrossolúvel de clorofila, para controlar o crescimento in vitro das três espécies pelo efeito fotodinâmico, causando estresse oxidativo. Como resultados pode-se observar que para controlar a *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9080) com as concentrações de 5 e 10 mg/L de clorofilina, a média foi de 29,50 ($\pm 4,89$) min para obter o efeito de controle fúngico. Para a concentração de 2 mg/L o efeito necessitou 90, 31 minutos de exposição. *Staphylococcus aureus* (ATCC 6359) demonstrou sensibilidade, porém menos que, necessitando maior concentração de clorofilina e maior tempo de exposição a luz. *Klebsiella pneumoniae* (KPC LBM 83) não apresentou sensibilidade para ação da clorofilina frente à exposição da luz, sugerindo que espécies gram negativas tem menos sensibilidade contra o efeito fotodinâmico do que gram positivas. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram o potencial de controle de microrganismos semelhantes aos obtidos na literatura para outras espécies.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae*; *Saccharomyces cerevisiae*; Terapia fotodinâmica antimicrobiana; Clorofilina.

**PHOTOBIOLOGICAL CONTROL BY CHLOROPHYLLIN IN STRAINS OF
Saccharomyces cerevisiae (ATCC 9080), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6359) AND
Klebsiella pneumoniae (KPC LBM 83)**

ABSTRACT

The bacteria *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* can impair the quality of life of human beings, especially those with pre-existing immunological impairments. Their control is hindered by the pathogenic characteristics they possess, particularly their ability to resist current antibiotics. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*, widely used in the brewing industry, can indirectly cause damage to the environment, such as the use of various toxic products for factory cleaning, as well as requiring a large amount of water for the sanitation process. This study aims to use chlorophyllin, a water-soluble derivative of chlorophyll, to control the in vitro growth of the three species through the photodynamic effect, causing oxidative stress. The results showed that to control *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9080) with concentrations of 5 and 10 mg/L of chlorophyllin, the average time required to achieve fungicidal control was 29.50 (± 4.89) minutes. For the concentration of 2 mg/L, the effect required 90.31 minutes of exposure. *Staphylococcus aureus* (ATCC 6359) demonstrated sensitivity, although it required a higher concentration of chlorophyllin and a longer exposure time to light. *Klebsiella pneumoniae* (KPC LBM 83) showed no sensitivity to chlorophyllin under light exposure, suggesting that gram-negative species are less sensitive to the photodynamic effect than gram-positive ones. The results obtained in this study demonstrate the potential for controlling microorganisms similar to those found in the literature for other species.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae*; *Saccharomyces cerevisiae*; antimicrobial photodynamic therapy; Chlorophyllin.

CONTRÔLE PHOTOBIOLOGIQUE PAR LA CHLOROPHYLINE DANS LES SOUCHES DE *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9080), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6359) ET *Klebsiella pneumoniae* (KPC LBM 83)

RESUMEN

En el contexto actual de la sociedad contemporánea, la salud pública cada vez más se centra en la calidad de vida de las personas, lo que hace indispensable la búsqueda constante de controles microbiológicos eficientes y sin efectos adversos, así como de alternativas sostenibles para preservar el medio ambiente en el que vivimos. Las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* son microorganismos que pueden afectar la calidad de vida de los seres humanos, especialmente aquellos con alguna debilitación inmunológica previa. El control de estas especies se ve dificultado por las características patogénicas que presentan, así como por su capacidad de resistencia a los fármacos actuales. Por otro lado, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ampliamente utilizada en la industria cervecera, puede causar daños al medio ambiente, como el uso de diversos productos tóxicos para la limpieza de la fábrica, así como una gran demanda de agua para el proceso de higienización. El presente estudio tiene como objetivo utilizar un enfoque diferente al convencional para controlar el crecimiento in vitro de las tres especies mencionadas anteriormente. Para ello, se utilizó la terapia fotodinámica, que consiste en el uso de un fotosensibilizador y una fuente de luz visible con el fin de generar toxicidad. Como resultado, se observó que *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9080) presentó un tiempo promedio de 29,50 ($\pm 4,89$) minutos para lograr un efecto en el control bacteriano con concentraciones de clorofilina de 5 a 10 mg/L. Para una concentración de 2 mg/L, el efecto requirió 90,31 minutos de exposición, lo que puede tener actividad bacteriostática o bactericida en diferentes exposiciones a la luz frente a la clorofilina. La bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 6359) también respondió bien al control fotodinámico y mostró actividad bacteriostática o bactericida en diferentes exposiciones a la luz frente a la clorofilina, aunque menos sensible que la levadura, requiriendo una mayor concentración de clorofilina y más tiempo de exposición a la luz. La bacteria Gram negativa *Klebsiella pneumoniae* (KPC LBM 83) no mostró sensibilidad a la acción de la clorofilina frente a la exposición a la luz. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron el potencial de control de microorganismos similares a los obtenidos en la literatura para otras especies.

Palabras-Clave: *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae*; *Saccharomyces cerevisiae*; terapia fotodinámica antimicrobiana; clorofilina.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Curva de correlação entre a absorvância a 550 nm em função do número de células x 10 ⁸ . ($r^2 = 0,9901$, $dv = 0,0347$)	23
Figura 2 – Esquema dos testes de determinação da eficiência antimicrobiana da clorofilina	26
Figura 3 – Fonte de luz padronizada para 550nm	27
Figura 4 – Efeito do crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9080) expostas a diferentes concentrações de clorofilina e em diferentes exposições à luz (12 mW/cm ²) após 24 horas de incubação	29
Figura 5 – Determinação da dose letal (LD ₅₀) da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9080) de diferentes concentrações de clorofilina (2; 5; 10; 50 e 100 mg/L respectivamente) sobre diferentes tempos de exposição à luz de 12 mW/cm ²	30
Figura 6 – Experimentos de crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9080) cultivada em ágar Sabouraud por 24 h após diferentes tempos de exposição à luz com 10 mg/L de clorofilina.	31
Figura 7 – Experimentos de crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9080) cultivada em ágar Sabouraud por 24 h após diferentes tempos de exposição à luz com 5 mg/L de clorofilina.	31
Figura 8 – Efeito do crescimento da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6359) expostas a diferentes concentrações de clorofilina e em diferentes tempos de exposições à luz (12 mW/cm ²) após 24 horas de incubação	33
Figura 9 – Determinação da dose letal (LD ₅₀) da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6359) de diferentes concentrações de clorofilina (2; 5; 10; 50 e 100 mg/L respectivamente) sobre diferentes tempos de exposição à luz de 12 mW/cm ²	34
Figura 10 – Experimentos de crescimento da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6359) cultivada em ágar BHI (LaborClin [®]) por 24 h após diferentes tempos de exposição à luz com 100 mg/L de clorofilina	34
Figura 11 – Relação da dose letal da exposição a luz (LD ₅₀) em relação a concentração sob ação clorofilina na bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6359) e na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9080).	35
Figura 12 – Efeito do crescimento da bactéria <i>Klebsiella pneumoniae</i> (KPC LBM 83) exposta a diferentes concentrações de clorofilina e em diferentes exposições à luz (12 mW/cm ²) após 24 horas de incubação.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito do crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9080) expostas a diferentes concentrações de clorofilina e em diferentes exposições à luz (12 mW/cm ²) após 24 horas de incubação	29
Tabela 2 – Valores de LD ₅₀ obtidos em diferentes concentrações de clorofilina 2; 5; 10; 50 e 100 mg/L respectivamente) sobre diferentes tempos de exposição à luz de 12 mW/cm ² da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9080).	30
Tabela 3 – Efeito do crescimento da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6359) expostas a diferentes concentrações de clorofilina e em diferentes exposições à luz (12 mW/cm ²) após 24 horas de incubação.....	32
Tabela 4 – Valores de LD ₅₀ obtidos em diferentes concentrações de clorofilina 2; 5; 10; 50 e 100 mg/L respectivamente) sobre diferentes tempos de exposição à luz de 12 mW/cm ² da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6359)	33
Tabela 5 – Efeito do crescimento da bactéria <i>Klebsiella pneumoniae</i> (KPC LBM 83) exposta a diferentes concentrações de clorofilina e em diferentes exposições à luz (12 mW/cm ²) após 24 horas de incubação.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APA – Ácido peracético

TFA – Terapia fotodinâmica antimicrobiana

ATCC – American Type Culture Collection

CH – Clorofilina

CIP – *Cleaning in Place*

FS – Fotossensibilizador

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

KPC – *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

SARM – *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

OMS – Organização Mundial da Saúde

VISA – *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina

VRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1	PANORAMA SOBRE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
3.1.1	Uso na cervejaria.....	14
3.1.2	Higienização da indústria.....	15
3.2	RESISTÊNCIA BACTERIANA	15
3.2.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	16
3.3	COMPREENSÕES SOBRE <i>Klebsiella pneumoniae</i> E <i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>	17
3.4	CLOROFILINA.....	19
3.5	TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA	19
4	INTERDISCIPLINARIDADE	21
5	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	22
5.1	ASPECTOS ÉTICOS	22
5.2	AMOSTRAGEM.....	22
5.2.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
5.2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	22
5.2.3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	22
5.3	QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE BACTÉRIAS	23
5.4	FOTOSENSIBILIZADOR	24
5.4.1	Extração da clorofilina	24
5.4.2	Teste da determinação efetiva da clorofilina.....	25
5.5	ESTUDO DA ESTABILIDADE DA CLOROFILINA FRENTE A LUZ.....	26
5.6	DESCARTE DO MATERIAL	27
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
6.1	EFEITOS DA CLOROFILINA NO COMPORTAMENTO DE CRESCIMENTO DE DIFERENTES MICRORGANISMOS.....	28
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
	ANEXO A	45

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, em todo o mundo há uma preocupação crescente com a qualidade de vida dos seres humanos. Dentro desta perspectiva, destaca-se um corpo saudável e um ambiente adequado. As bactérias são essenciais para o bom funcionamento do organismo humano, porém, podem apresentar capacidade patogênica. Sendo seres unicelulares que habitam naturalmente o corpo humano e quando associadas a infecções são controladas via de regra com a antibioterapia. Quando foram descobertos os primeiros antibióticos, imaginou-se que seria o fim das doenças infecciosas, contudo as bactérias multidroga-resistentes trouxeram dúvidas deste possível fim (RICHTER *et al.*, 2019).

Como havia sido descoberto a “solução” para os problemas infecciosos, não se fez mais necessário estudos e investimentos em outras possíveis alternativas com a mesma finalidade. Reduziu-se assim o progresso na terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFA) que desde o ano 1900 sabia-se dessa experiência de induzir morte celular utilizando uma fonte de luz sem gerar resistência microbiana (AMARAL *et al.*, 2010) e que foi utilizada pela primeira vez somente em 1960 (GHORBANI *et al.*, 2018).

Para Chevrette *et al.* (2019) o surgimento de patógenos multirresistentes é contínuo e se faz necessário descobrir novas formas naturais de combate. Existindo assim, uma preocupação mundial com os microrganismos resistentes aos antimicrobianos, principalmente quando associados a pacientes hospitalares imunossuprimidos. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (GELATTI *et al.*, 2009) e *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) (SILVA *et al.*, 2022b) são exemplos de bactérias resistentes e causadoras de infecções nosocomiais que causam debilitações em pacientes com algum transtorno imunológico.

O meio ambiente é essencial para a manutenção da vida e faz-se necessário toda e qualquer forma de preservação do mesmo. A *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) atualmente é indispensável em alguns âmbitos. Sendo comumente utilizada na panificação (BEZERRA, 2021) e na fabricação de bebidas alcoólicas (PARAPOULI *et al.*, 2020). Sendo que esta utilização pode gerar consequências negativas para o meio ambiente.

Usualmente, as indústrias cervejeiras utilizam da *S. cerevisiae* para poder obter o seu produto de venda e isso requer equipamentos e tubulações que demandam de produtos químicos para realizar a limpeza. De acordo com Bratti (2018) no processo de higienização da microcervejaria, se utiliza diversos produtos químicos, o que para Carrera (2015) juntamente com o fato de necessitar de uma alta quantidade de água, contribui de forma significativa na

qualidade do ambiente. Ainda, há outras consequências, como o fato de ser descartado grande quantidade microbológica no ambiente.

O presente estudo visa então usufruir da clorofilina (CH), que é um composto derivado da clorofila, juntamente com a TFA para controlar *S. cerevisiae*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* por não causar resistência antimicrobiana, por ser natural e possivelmente não prejudicar o meio ambiente.

Para melhor entendimento, esta dissertação está dividida em capítulos, no qual o próximo destaca os objetivos desta pesquisa. Em seguida, o capítulo três dispõe sobre a revisão de literatura, trazendo os principais aspectos estudados anteriormente sobre o tema. Em sequência, o capítulo quatro demonstra os aspectos relacionados com a interdisciplinaridade do presente estudo. Posteriormente, os procedimentos metodológicos compõem o quinto capítulo, que descreve como o estudo foi realizado. Na sequência, o sexto capítulo explana os resultados obtidos através da experimentação. Adiante, o capítulo sete sugere as contribuições finais com base nos resultados. Por fim, o oitavo capítulo relaciona as referências bibliográficas utilizadas para realização dessa investigação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da clorofilina como fotossensibilizadora no controle fotodinâmico de *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Testar a eficiência da clorofilina agregada à luz de LED como controladora de *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*.
- b) Analisar os efeitos microbiostáticos e ou microbicidas da clorofilina ao controlar *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*.
- c) Determinar os valores da dose letal de *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PANORAMA SOBRE *Saccharomyces cerevisiae*

São seres unicelulares, com o seu genoma (6000 genes) totalmente descritos (GOFFEAU *et al.*, 1996). Sendo que as células desta espécie são descritas como elípticas e medem de 6 a 8µm, com 5 µm de largura (MONTENEGRO, 2017). A reprodução desta espécie pode ocorrer por brotamento ou gemulação (MONTENEGRO, 2017) e a parede celular é composta por glucana, dos tipos β -(1,3)-D-glucana e β -(1,6)-D-glucana, quitina e manoprotéínas, sendo todos ligados de forma covalente (HA *et al.*, 2002).

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) é uma levedura muito utilizada na produção de pão, que há milhares de anos alimenta as populações mundiais. Sendo um modelo para a pesquisa básica (PARAPOULI *et al.*, 2020). De acordo com Nogueira e Silva Filho (2015) *S. cerevisiae* é uma levedura pertencente ao filo Ascomycota, com importante atuação também na produção de álcool, vinho, cachaça e cerveja, atuando no processo de fermentação.

3.1.1 Uso na cervejaria

De acordo com o artigo 36 do Decreto nº 9.902, de 8 de julho de 2019 (BRASÍLIA, 2019), “cerveja é a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo”. Há indícios de uma cerveja primitiva chamada “*Cauim*” que já era produzida antes de 1500 pelos indígenas pela fermentação do milho ou da mandioca (ROSALIN, 2021). Segundo Coutinho, Quintella e Panzani (2020), a cerveja chegou ao Brasil em 1808, através da família real portuguesa, pois o rei era um grande apreciador da bebida, mas a questão das primeiras indústrias não é bem estabelecida por não se ter registros evidentes.

A Associação Brasileira da Indústria da Cerveja elenca quatro etapas no processo de produção da cerveja: 1- preparo do mosto; 2- fermentação e maturação; 3- filtragem; 4- Envase. Para realizar a segunda etapa, podem ser utilizados os microrganismos fermentadores. Para Pontes (2021) *S. cerevisiae* é a levedura mais utilizada na produção de bebidas alcoólicas, onde obtém-se álcool pela via fermentativa, ou seja, ao se multiplicarem mesmo na falta de O₂ (por serem anaeróbios facultativos) produzem etanol. Ademais, a utilização de *S. cerevisiae* como fermentador vem ocorrendo há mais de 10 mil anos (LITI, 2015).

O Brasil está em terceiro lugar no *ranking* mundial de produção de cerveja (14,1 bilhões l/ano), sendo responsável por 1,6% do PIB nacional (CERVBRASIL, 2016). De acordo com o Anuário da Cerveja de 2020 publicado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a demanda por cerveja no Brasil de 2020 para 2021 cresceu 14,4% totalizando 1.383 cervejarias registradas neste Ministério (MAPA, 2021). Cada uma dessas fábricas necessita de equipamentos para realizar sua produção e estes exigem uma higienização particular e fundamental para a qualidade do produto.

3.1.2 Higienização da indústria

O processo utilizado na limpeza da indústria cervejeira é chamado de *Cleaning in Place* (CIP) e é o maior gerador de resíduos (químicos e água) quando se trata de processos produtivos (CARRERA, 2015). Para realizar este processo são usados desinfetantes a base de ácido peracético (APA), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), cloro ativo e quaternário de amônia, juntamente com detergentes alcalinos e ácidos (BRATTI, 2018).

Para Cavallini *et al.* (2012) o APA e o H₂O₂ de acordo com a concentração utilizada podem afetar o microbioma aquático, atingindo sua fauna e flora, e ainda, podem favorecer a formação de novos subprodutos. O H₂O₂ é um grande causador de chuvas ácidas (MATTOS *et al.*, 2003). O APA é um sanitizante e juntamente com a soda cáustica, que é um exemplo de detergente alcalino, ao serem descartados podem prejudicar os trabalhadores da indústria cervejeira (OLIVEIRA, 2019).

A soda cáustica pode causar toxicidade para quem manipula e pode gerar resíduos alterando a qualidade ambiental (ARAÚJO *et al.*, 2020). O cloro ativo quando em contato com alguns compostos orgânicos está relacionado com a formação dos trihalometanos (MEYER, 1994), sendo que Silva e Melo (2015) relacionam os trihalometanos como sendo um possível causador de câncer.

3.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA

As bactérias contribuem com a saúde humana, contudo, algumas espécies são oportunistas e causam infecções. Com a intenção de controlar as bactérias patogênicas vêm-se utilizando como principal alternativa, os antibióticos (SOUZA *et al.*, 2021). Estes fármacos podem ser bactericidas quando geram morte celular ou bacteriostáticos quando inibem o crescimento bacteriano (GARCIA; COMARELLA, 2021). Ao serem expostas aos antimicrobianos, as bactérias de forma natural, adaptam-se e criam resistência contra o

medicamento e o uso irregular destes fármacos contribui com o surgimento de mais mecanismos de resistência (SANTOS, 2004). Como as subdosagens que tornam falho o tratamento e acabando selecionando as cepas resistentes (CHAGAS, 2016). Adendo a isto, segundo Magiorakos *et al.* (2012) o problema de resistência é crescente e existem tanto bactérias gram-positivas quanto gram-negativas resistentes às drogas. Neste contexto, destaca-se as espécies: *S. aureus* e *K. pneumoniae*.

3.2.1 *Staphylococcus aureus*

A bactéria *S. aureus* é uma espécie anaeróbia facultativa, que pertence à família Staphylococcaceae, à ordem Bacillales e à classe Bacilli (SANTOS *et al.*, 2007). Este microrganismo é caracterizado como gram-positivo (possui coloração roxa para o teste), em formato de cocos e disposição em cachos (TAYLOR; UNAKAL, 2022), é esférico e com um diâmetro de 0,5 a 1,5 μm (SANTOS *et al.*, 2007).

Normalmente habita o corpo humano sem causar algum tipo de prejuízo ao hospedeiro, entretanto, pode ocasionar infecções simples ou complexas (SANTOS *et al.*, 2007). Como a capacidade de desencadear situações patogênicas em diversos transtornos crônicos das vias aéreas (FLORA *et al.*, 2019), sepse, (SIWCZAK *et al.*, 2022) e imunossupressão (ZWACK *et al.*, 2022).

No contexto de infecções hospitalares, *S. aureus* é um agente frequentemente isolado em feridas cirúrgicas, pele e sangue, tendo a diálise renal como o procedimento mais comum ligado à estas infecções, causando sepse e reação pirogênica (ANVISA, 2004).

Por sua vez, *S. aureus* está relacionado com altas taxas de bacteremia e endocardite em pacientes hospitalizados, com altos índices de óbitos (ANVISA, 2021) devido à sua patogenicidade e a sua resistência aos antimicrobianos. Justamente porque quando a infecção é causada por uma cepa multirresistente, há baixa eficiência no tratamento (OMS, 2014).

Alguns fatores colaboram com o potencial patogênico da espécie. Como a capacidade de multiplicação, a produção de enzimas e as toxinas patogênicas, sendo que além da presença de polissacarídeos na parede celular, que atribuem à *S. aureus* uma proteção maior contra a fagocitose (ALMEIDA *et al.*, 2016) há também peptidoglicano, que aparentemente está relacionado com a resposta inflamatória do hospedeiro, através ativação da via alternativa do sistema complemento (FARIA, 2008).

Ademais, estudos comprovam ainda que *S. aureus* possui a capacidade de se reproduzir de forma muito eficiente dentro dos macrófagos humanos (TUFFS *et al.*, 2022). Para ativar os

macrófagos e assim disseminar a infecção, instiga-se um recrutamento de monócitos circulantes para o local da infecção, que contribuem para a ativação destas células fagocitárias no fígado (SIWCZAK *et al.*, 2022). Sendo que os genes acessórios (como os mecanismos regulatórios e os fatores de virulência) compõe proteínas que são liberadas no meio extra celular e permitem a aderência das células bacterianas às células hospedeiras e fortalecem a degradação e obtenção de nutrientes, tornando o hóspede dominante sobre o hospedeiro (JENUL; HORSWILL, 2019).

Além destes fatores, a resistência aos antimicrobianos reforça a patogenicidade da espécie. Sendo que em 2017 a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma lista de patógenos prioritários ao se referir à resistência aos antibióticos, classificando-os em prioridades: crítica, alta e média e dentre os grupos, classificou *S. aureus* na segunda categoria, quando, resistente à meticilina e com sensibilidade intermediária ou resistentes à vancomicina (OMS, 2017).

As primeiras cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (SARM) surgiram na década 60, após adquirirem um novo gene, denominado de *mecA* que codifica uma alteração às proteínas de ligação à penicilina (OMS, 2014). Esta alteração gera uma diminuição na ação antimicrobiana das β -lactamases (SCUDIERO *et al.*, 2020).

Para Choo e Chambers (2016) a vancomicina é um grande aliado para combater SARM, contudo o surgimento de *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA) ou com resistência intermediária (VISA) é um fator preocupante, tornando-se necessário formas mais eficazes de controle microbiano. Ainda segundo os autores, inicialmente *S. aureus* era suscetível aos antibióticos, mas a transferência horizontal de genes externos mudou este cenário. O que nos leva atualmente à busca por alternativas eficientes de controlar *S. aureus*, sem contribuir para a geração de resistência.

3.3 COMPREENSÕES SOBRE *Klebsiella pneumoniae* E *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*

A bactéria *K. pneumoniae* é membro da família Enterobacteriaceae, portanto é uma bactéria gram-negativa e anaeróbia facultativa (CUNHA, 2014) que possui cápsula, formato de bastonete e é imóvel (OCTAVIA; LAN, 2014). Usualmente, habita regiões ambientais (CUNHA, 2014) sendo que em 2018 foi isolada pela primeira vez em culturas de *Oreochromis niloticus* (L.) no Brasil, ocasionando a morte em massa dos indivíduos e gerando preocupação para a saúde humana (SILVA *et al.*, 2022a).

Segundo os estudos de Silva *et al.* (2022b) é possível observar altos índices de cepas bacterianas MDR e de genes de virulência ao isolar cepas de *K. pneumoniae* em indivíduos humanos internados em hospitais. De acordo com a abordagem de Ballén *et al.* (2021) nota-se a ocorrência de infecções causadas por *K. pneumoniae* em diversas regiões anatômicas, como a urina, o trato respiratório e o sangue.

Em virtude de ser um patógeno oportunista, com capacidade de disseminação de clones multirresistentes e causar vários tipos de infecções, em especial nos pacientes nosocomiais ou imunossuprimidos, *K. pneumoniae* tornou-se uma preocupação para a saúde pública do mundo (SILVA *et al.*, 2022b).

Em suma, alguns fatores contribuem com a patogenicidade de *K. pneumoniae*, como a criação de biofilmes, presença de genes de virulência, resistência sérica, hiper mucoviscosidade (BALLÉN *et al.*, 2021) e ainda, a presença de uma cápsula espessa (PRINCE *et al.*, 1997) que pode possuir uma alta variabilidade de polissacarídeos (ARATO *et al.*, 2021). Além disso, grande parte das cepas bacterianas contam com um maquinário enzimático de grande eficiência, que é capaz de inativar as moléculas dos antibióticos e desta forma prolongar a reação infecciosa no hospedeiro (MARTIN; BACHMAN, 2018).

Ademais, é uma espécie com capacidade de gerar resistência contra os antimicrobianos produzindo enzimas (ARNOLD *et al.*, 2011). Desta forma, a *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) é uma enzima da classe b-lactamase, capaz de tornar bactérias resistentes contra os carbapenêmicos, fármacos esses, que são de largo espectro e amplamente utilizados (YIGIT *et al.*, 2001). A bactéria *K.pneumoniae* é a espécie que mais comumente está associada com a enzima KPC (ARNOLD *et al.*, 2011) sendo que o primeiro relato de *K. pneumoniae* produtora de KPC foi em 2001 na Carolina do Norte (YIGIT *et al.*, 2001).

Usualmente, a KPC está associada à flora intestinal e a transmissão pode ocorrer pelo contato pessoal (SILVA *et al.*, 2019) ou ambiental (CUNHA, 2014). Em situações de infecções nosocomiais, a identificação de KPC é recorrente (SILVA *et al.*, 2019) e ocorre mundialmente (SEIBERT *et al.*, 2014). A KPC está relacionada com altas taxas de mortalidade e torna as bactérias resistente aos antibióticos mais comuns, incluindo polimixinas, tigeciclina e aminoglicosídeos (KARAIKOS *et al.*, 2021). Causando assim também, uma preocupação internacional para a saúde pública, portanto, é importante implementar medidas eficazes de controlar *K. pneumoniae* produtoras de KPC sem contribuir negativamente com o fator resistência.

3.4 CLOROFILINA

A clorofila é um pigmento extremamente abundante, de fácil acesso, baixo custo e pertence a um grupo muito importante de fotossensibilizador (FS), as porfirinas (KRÜGER *et al.*, 2019). Está presente nos cloroplastos das plantas, auxiliando na etapa fotoquímica da fotossíntese e teve seu nome proposto em 1818 por Pelletier e Cavento, designando a substância verde capaz de ser extraída das folhas com uso de álcool (STREIT *et al.*, 2005). Ao retirar a camada de fitol da clorofila, obtém-se a Clorofilina, que é um composto hidrossolúvel (RICHTER *et al.*, 2014), por isto, a CH é mais viável do que a clorofila (hidrofóbica) ao que se refere TFA.

Anteriormente, a CH demonstrou ser virucida para o poliovírus, quando utilizada a TFA (FACCIN *et al.*, 2008). Adicionalmente, estudos como o de Wohllebe *et al.* (2011) demonstram que o potencial da CH como FS em TFA controlando larvas de dípteros é eficiente. Bem como Erzinger *et al.* (2011) demonstraram a eficiência deste mesmo processo no controle de parasitas aquáticos. Posteriormente, a pesquisa de Richter *et al.* (2019) mostrou que a clorofilina inibiu efetivamente o crescimento de *Escherichia coli* e de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

Adendo a isto, o estudo de Rocha (2017) que ao avaliar a toxicidade e citotoxicidade da CH como fotossensibilizador em células meristemáticas de raízes de cebolas (*Allium cepa*) obteve o resultado negativo e o estudo de Erzinger *et al.* (2015) que observou à curto prazo que a CH não apresenta riscos ao meio aquático, sugerem indícios de que a CH não apresenta riscos ao meio ambiente, mesmo que maiores investigações nesta perspectiva sejam necessárias para uma maior confiabilidade.

3.5 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

De acordo com Amaral *et al.* (2010) há mais de cem anos sabe-se que se pode induzir a morte celular interagindo substâncias químicas com a ação da Luz. A TFA é a utilização de um FS em conjunto com uma luz visível a fim de gerar uma resposta fototóxica na presença de oxigênio (GHORBANI *et al.*, 2018; SIMÕES *et al.*, 2019). Para que ocorra a ativação do FS é necessário um comprimento de onda específico.

Após a fotoativação do FS formam-se espécies reativas de oxigênio, um elétron do FS é transferido para um estado singlete ativo, que por sua vez tem um tempo de vida curto, e logo torna ao seu estado fundamental, liberando energia, como fóton de fluorescência ou calor (KRÜGER *et al.*, 2019). A reação fotodinâmica ocorre em dois mecanismos, sendo que o tipo

I é a transferência do elétron, que acontece de forma rápida e gera íons-radicais, que reagem com o oxigênio no estado fundamental, gerando produtos oxidados e o tipo II é a transferência de energia que resulta na liberação de um agente altamente citotóxico, o oxigênio singlete (MACHADO, 2000).

Segundo Ghorbani *et al.* (2018) existem diversas vantagens ao utilizar esta terapia como controle microbiológico, sendo elas: capacidade bactericida mesmo quando apresentam resistência; efeitos colaterais e danificação do tecido limitados; mesmo após várias sessões da terapia não ocorre resistência e potencial de atuar em protozoários, fungos e bactérias. Esta terapia vem sendo aplicada em diversos âmbitos.

A TFA pode ser utilizada para tratar ceratoses actínicas na face e no couro cabeludo (RODRIGUES *et al.*, 2017). Pesquisas como a de Teodoro e Fernandes (2020) demonstram que a TFA corrobora com mecanismos tradicionais no tratamento de candidíase oral. Ademais, pode-se utilizar a TFA, contra vários tumores malignos, em câncer de pele (não melanoma) ou ainda em dermatoses não neoplásicas (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

Sendo assim, no presente estudo, utilizou-se a TFA com um composto derivado da clorofila como FS a fim de controlar *S. aureus* e *K. pneumoniae*, pois para Krüger *et al.* (2019) é uma abordagem promissora no controle bacteriano. Somando às bactérias, utilizou-se da TFA no controle de uma levedura (*S. cerevisiae*), corroborando com Jackson *et al.* (1999) que utilizaram o azul de toluidina como FS para erradicar *Candida albicans* tanto em estado de levedura, como de hifa, sendo que na forma hifal exigiu uma menor concentração do corante.

4 INTERDISCIPLINARIDADE

As infecções nosocomiais atingem grande parte da população, logo, quando ocasionadas por patógenos resistentes às drogas, torna-se um tratamento difícil, portanto, abordagens que não gerem resistência são indispensáveis. Ao ponto que controlarmos *S. aureus* e *K. pneumoniae* que tangenciam um problema de saúde sem acarretar prejuízos posteriores, colabora-se para saúde pública.

A limpeza de tanques na indústria cervejeira é um risco em potencial para o meio ambiente, e a geração de resíduos tóxicos, deliberados na natureza podem danificar até mesmo um ecossistema, sendo que o meio ambiente é um fator essencial para a boa qualidade de vida.

Este trabalho, em decorrência dos fatores acima citados, com o eixo da interdisciplinaridade, não visa as técnicas de microbiologia tradicional e sim ferramentas e propostas de desenvolvimento de novos procedimentos utilizando de um composto químico presente na natureza como forma de controle de microrganismos resistentes às drogas convencionais e outro que a sua utilização na indústria causa danos ambientais.

Por consequência, controlar *S. aureus* e *K. pneumoniae* para uma melhor qualidade de vida dos pacientes e diminuir os impactos ambientais da utilização de *S. cerevisiae*.é necessário englobar áreas como: Saúde, Ambiente, Indústria, Microbiologia, Química, Biologia e Bioquímica.

5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Trata-se de um estudo experimental, de delineamento explicativo e rigor científico *in vitro*. Primeiramente será realizado um teste piloto a fim de verificar a aplicabilidade das metodologias levantadas de acordo com o pressuposto do estudo em questão.

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo não abrange seres humanos de forma direta e outros animais vertebrados, logo, não se faz necessário a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

5.2 AMOSTRAGEM

5.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

A cepa utilizada de *Saccharomyces cerevisiae* foi a ATCC 9080. Para o cultivo de *S. cerevisiae* em meio líquido foi utilizado o meio de cultura YMA (Yeast, Manitol, Ágar) composto por 3% de extrato de levedura (Himedia), 3% extrato de malte (Biolife) e por 5% peptona bacteriológica (Himedia) com 10% de glicose (Êxodo Científica) para a ativação de 24 horas e 20% de glicose (Êxodo Científica).

Para os ensaios de foto inibição foi utilizado caldo Yeast Peptone Dextrose (YPD) (Sigma-Aldrich®) incubadas overnight a 28°C. Para os testes de crescimento e para contagem de colônias em Agar Sabouraud (NeyProv®).

5.2.2 *Staphylococcus aureus*

A cepa utilizada de *Staphylococcus aureus* foi ATCC 6359. A fim do preparo da suspensão, após o descongelamento da mesma, a cepa foi reativada em tubo contendo caldo BHI e incubada a 36°C ±1 por até 48h. A partir do caldo Brain Heart Infusion (BHI) (LaborClin®) inoculado.

Para os ensaios de foto inibição foi utilizado caldo BHI (LaborClin®). Para os testes de crescimento e para contagem de colônias em Agar Clead (LaborClin®).

5.2.3 *Klebsiella pneumoniae*

As cepas utilizadas foram *Klebsiella pneumoniae* KPC LBM 83 que forão inoculados em caldo “Brain Heart Infusion” (BHI) (LaborClin®) à 37°C por 4 h. para enriquecimento. Após

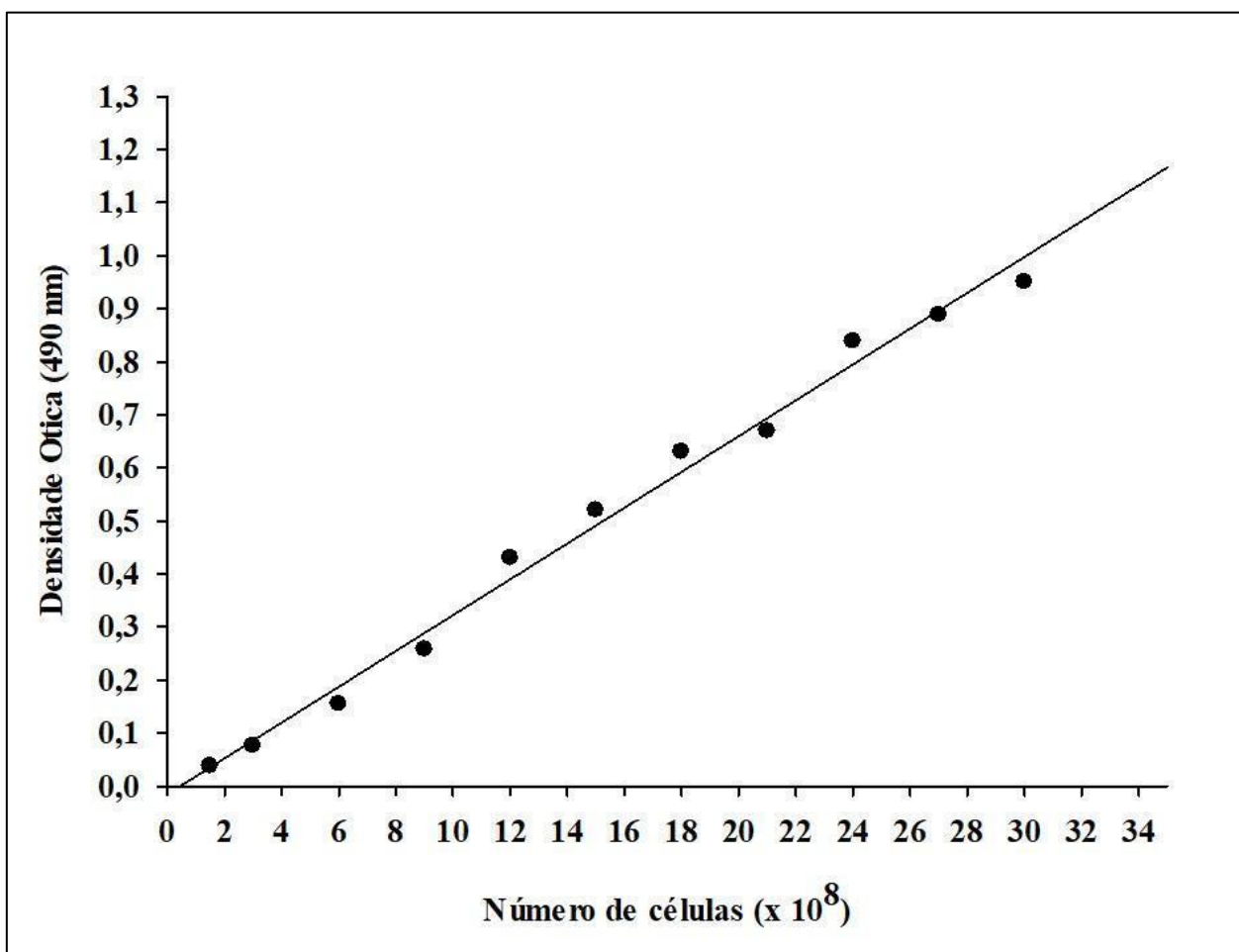
esse período, a cultura foi semeada pela técnica de esgotamento, em placas de ágar MacConkey (DIFCO®) e incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação, as colônias lactose positivas (róseas), mucoides e superfície lisa foram selecionadas.

Para os ensaios de foto inibição foi utilizado caldo “Brain Heart Infusion” (BHI) (LaborClin®). Para os testes de crescimento e para contagem de colônias em Agar Clead (LaborClin®).

5.3 QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE BACTÉRIAS

Para a quantificação do número de bactérias foi feita a conversão da escala de McFarland através da leitura da densidade ótica por absorbância em relação ao número de bactérias por mL em espectrofotometria Reader em microplacas de 12 cubetas de 500 mg cada conforme demonstrado na Figura 1.

Figura 1 – Curva de correlação entre a absorbância a 550 nm em função do número de células x 10⁸. ($r^2 = 0,9901$, $dv = 0,0347$)



Fonte: Elaborado pelos pesquisadores (2023).

O número de células $\times 10^8$ foi obtido utilizando a equação 01.

Equação 01: Número de células $nC = \frac{do+0,015}{0,0336}$

5.4 FOTOSSENSIBILIZADOR

5.4.1 Extração da clorofilina

A clorofilina foi extraída conforme Krüger et al. (2019), com algumas adaptações. Em breve, utilizou-se o espinafre *Tetragonia tetragonoides* no lugar da *Spinacia oleracea*, visto que esta espécie não é tão comum no Brasil.

As plantas foram obtidas em uma frutaria e após foram lavadas. Depois, foram retirados os caules. As folhas (664g) foram branqueadas em 4 L de água fervente com 2 g de bicarbonato de sódio por 3 min. Excesso de água foi removido espremendo as folhas. Subsequentemente, as folhas (peso restante 228g) foram trituradas em um liquidificador com etanol absoluto por 1 min. Depois, a massa foi distribuída sobre algodão num funil cerâmico e o etanol removido por vácuo. A massa seca foi lavada duas vezes com mais etanol absoluto até ficar “pálido”. O volume final da extração etanólica era 750ml. Em um funil de separação, misturou-se o extrato com éter de petróleo (220 mL, temperatura de ebulição 50 – 110 °C) e esperou separação de fase. A clorofila migrou pela fase etérica superior, deixando-a verde, enquanto a fase etanólica inferior tornou-se mais amarela. A fase etanólica foi descartada. Uma amostra da fase etérica foi retirada para determinação da concentração de clorofila: a amostra foi evaporada e resuspendida com acetona (80%), de acordo com Porra (2002). A absorção foi mensurada espectrofotometricamente às 646 nm, 663 nm e 750 nm, e a concentração foi calculada em nmol/mL.

A fase etérica foi misturada com 0.5mM solução metanólica de KOH (MeOH-KOH). A clorofila perto da interface das fases é saponificada e passa pela fase metanólica. Depois de 24h, a fase metanólica foi retirada e substituída com mais MeOH-KOH. Após umas horas, quase toda a clorofila é transformada em clorofilina e fica na fase metanólica (volume final: 55 mL). De novo, uma amostra da fase etérica foi retirada. As concentrações de clorofila no éter após-saponificação foram determinadas como descrito em cima, e depois calculados para obter $\mu\text{g/mL}$. Os valores mostraram que 99.8% da clorofila foi saponificada (74.85 vs. 0,17 mg, rendendo uma solução final de 1,35 mg/mL).

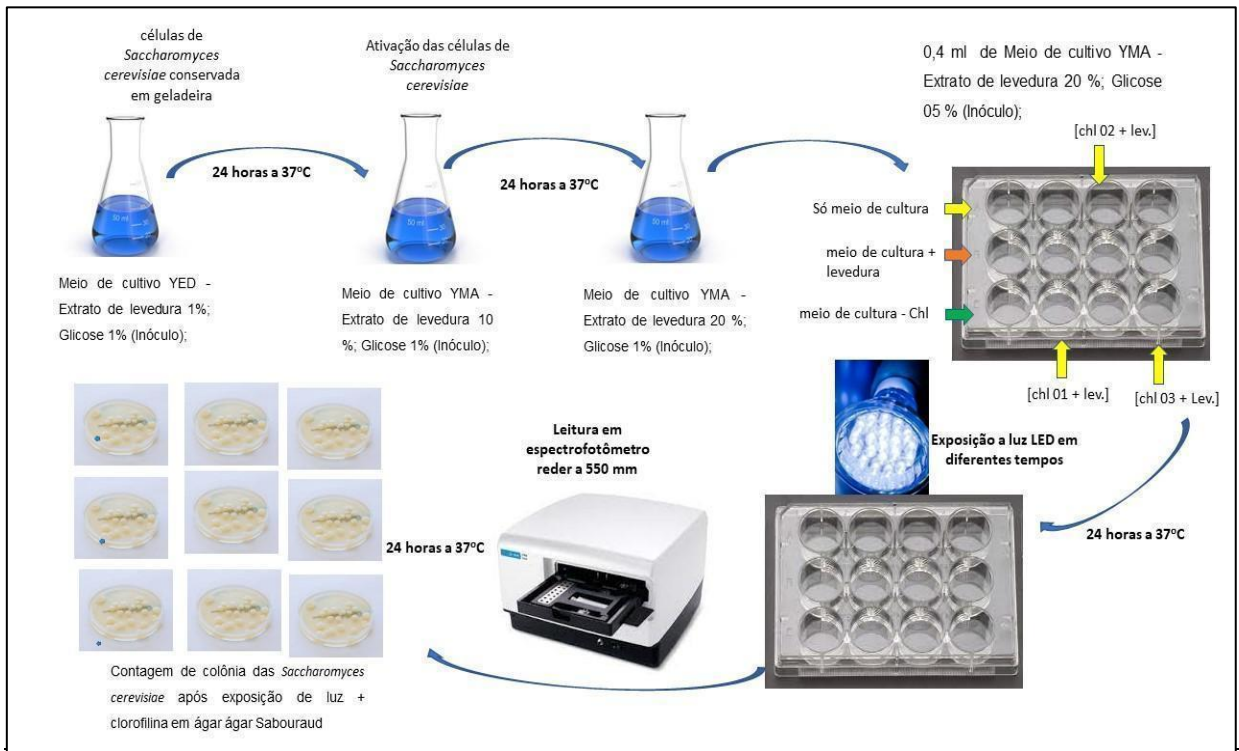
Para facilitar o uso, alíquotas de 1 mg de clorofilina foram preparadas, evaporando 0,738 mL da solução final. O resíduo seco é congelado e depois diluído com água destilada de acordo com as concentrações desejadas.

5.4.2 Teste da determinação efetiva da clorofilina

Para a determinação do estudo de inibição fotodinâmica da clorofilina foi utilizado sistema de microplacas da Kasvi modelo K12-012 com 12 cubetas de 5,0 mL. Para a *S. cerevisiae* foram utilizados 4,0 ml de meio YMA (Yeast, Manitol, Ágar) da SigmaAldrich (EUA) com 20% de glicose. Para a bactéria *S. aureus* foi utilizado o meio de crescimento BHI (brain heart infusion) da Laborclin produtos de laboratório Ltda com 2% de glicose. Os testes foram feitos em triplicatas, uma solução apenas com meio de cultura (controle negativo), uma com meio de cultura e o inóculo (controle positivo) e outra com o meio de cultura e clorofilina para que pudesse ser descontado a absorvância da cor do meio de cultura e da clorofilina, durante as leituras. Para verificação da atividade antimicrobiana foram utilizadas concentrações de 2, 5, 10, 50 e 100 mg/L da clorofilina. Para fim de inóculo foi determinada uma concentração inicial de *S. cerevisiae*, *K. pneumoniae* e de *S. aureus* em torno de $1,0 \times 10^8$ células.

Após inoculados foram feitas a leituras em Fotômetro Plate Reader Biotec FLX 800 (Fisher Scientific, USA) em 550 nm. Foram realizados dois procedimentos. O primeiro após a inoculação a 37° C foi incubado no escuro por 24 horas. As demais placas foram submetidas a exposição de luz de 30 minutos, uma, duas, três e quatro horas sob luz de led. Todos os experimentos foram feitos em triplicatas. Na Figura 2, apresentamos um esquema ilustrativo de como é realizado o teste da determinação efetiva da clorofilina.

Figura 2 – Esquema dos testes de determinação da eficiência antimicrobiana da clorofiliana

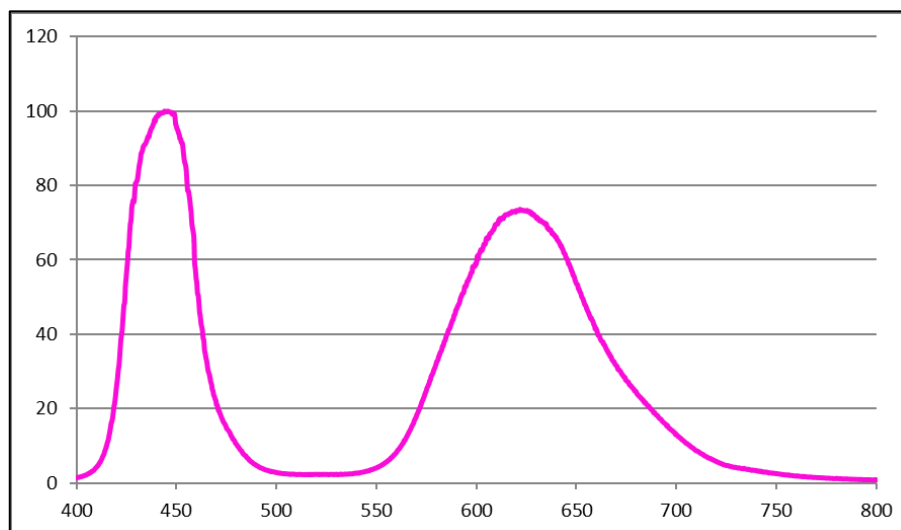


Fonte: Elaborado pelos pesquisadores (2023).

5.5 ESTUDO DA ESTABILIDADE DA CLOROFILINA FRENTE A LUZ

Para avaliação da degradação da clorofilina frente a luz foram utilizadas diferentes concentrações (5; 10; 50; e 100 mg/L) tendo uma amostra controle na ausência de luz em meio YMA (Yeast, Manitol, Ágar) com 10% de glicose e uma fonte de iluminação com 12 mW/cm² composta por 6 leds de 50W (Aamasun, full spectrum growth light) com espectro padronizado para 550nm demonstrado na Figura 3.

As amostras foram retiradas em vários pontos de tempo (0; 30 min, 1 h; 120 e 180 minutos respectivamente). Os espectros de absorção foram registrados com um espectrofotômetro UV-180A (Shimadzu, Kyoto, Japão). Além disso, as concentrações de clorofilina foram determinadas conforme descrito anteriormente por Porra, Thompson e Kriedemann (1989). Todos os experimentos foram feitos em triplicatas.

Figura 3 – Fonte de luz padronizada para 550nm

Fonte: Elaborado pelos pesquisadores (2023).

5.6 DESCARTE DO MATERIAL

Os materiais descartáveis foram esterilizados na autoclave, após, descartados em lixo comum. Os outros materiais foram banhados por 24h em uma solução de hipoclorito de sódio ou formaldeído (Lysoform) e somente após serão lavados.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análises estatísticas os resultados foram inicialmente lançados em planilha Excel (Microsoft, EUA) e posteriormente feita as análises estatística utilizando o software SigmaPlot ver. 12.5 (Systat Software Inc., EUA).

Para determinação da concentração letal de 50% (LD_{50}) foi estimada usando a Eq. (2) ajustado ao conjunto de dados pelo método de regressão sigmoide de três parâmetros (ERZINGER *et al.*, 2015).

Equação 2:

$$y = \frac{y_0}{1 + \left(\frac{c}{LD_{50}}\right)^b}$$

Onde y é a variável de resposta (porcentagem de organismo morto), c a concentração de clorofila, y_0 é a resposta quando a concentração tende ao infinito e b é uma escala fator. Os intervalos de confiança foram calculados a partir da covariância matriz a um nível de erro de dois lados de 5%. Todos os dados são expressos como média \pm desvio padrão (DP).

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este estudo visou comparar o controle do crescimento em três diferentes microrganismos frente à atividade fotodinâmica da clorofilina. As três espécies foram selecionadas por apresentarem diferenças morfológicas a nível de parede celular. Foi escolhido uma levedura (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080), uma bactéria Gram positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 6359) e uma bactéria Gram negativa (*Klebsiella pneumoniae* KPC LBM 83) sendo resistente a diferentes antibióticos.

Segundo Giguère, Prescott e Dowling (2013) as drogas antimicrobianas exploram diferenças na estrutura ou função bioquímica entre hospedeiro e parasita. Nos últimos anos, drogas antifúngicas e antivirais cada vez mais eficazes foram introduzidas na prática clínica. Os medicamentos antimicrobianos podem ser classificados de várias maneiras, com base em quatro características básicas. Essas características incluem classe de microrganismo, atividade antibacteriana, atividade bacteriostática ou bactericida e atividade dependente do tempo ou da concentração. Os mecanismos de ação das drogas antibacterianas se enquadram em quatro categorias: inibição da síntese da parede celular, dano à função da membrana celular, inibição da síntese ou função do ácido nucléico e inibição da síntese proteica. O conhecimento dos diferentes mecanismos de ação dos antimicrobianos fornece alguma capacidade de prever sua interação quando são usados em combinação.

6.1 EFEITOS DA CLOROFILINA NO COMPORTAMENTO DE CRESCIMENTO DE DIFERENTES MICRORGANISMOS

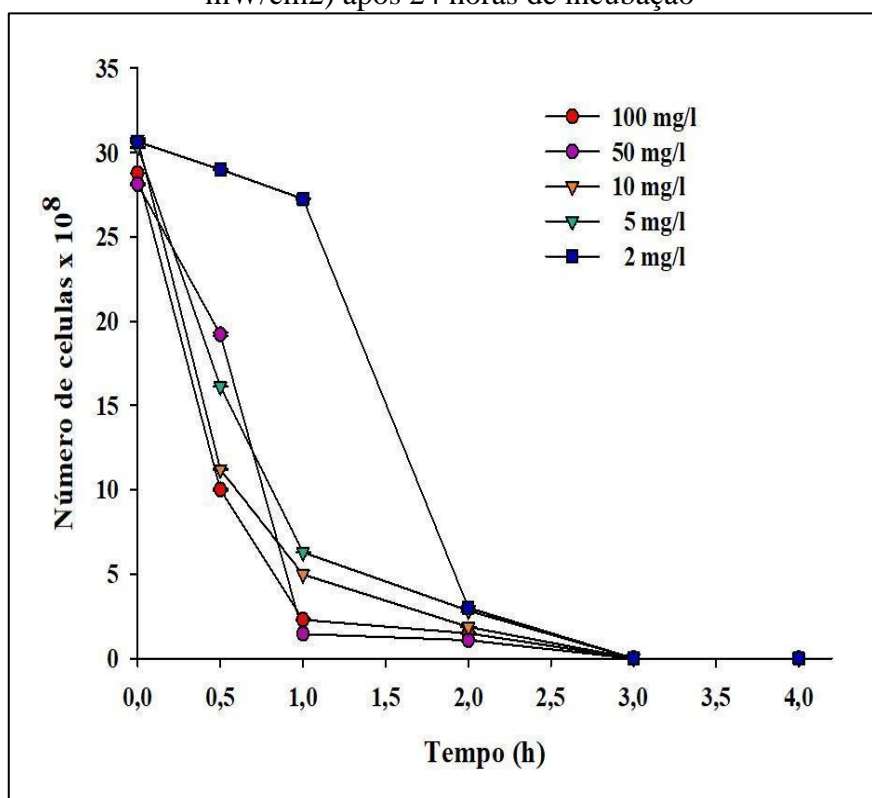
No primeiro estudo observou-se a capacidade de controle fotodinâmico da clorofilina sobre a levedura *S. cerevisiae*. Foram utilizadas cinco concentrações diferentes de clorofilina em diferentes tempos de exposição à luz. Os resultados estão descritos na Tabela 1 e Figura 4 descritas a seguir. Em todos os resultados obtidos foram observados uma diminuição do crescimento a partir de 30 minutos de exposição à luz. A única exceção foi a concentração de 2 mg/L que apresentou uma inibição a partir de 2 horas de exposição.

Tabela 1 – Efeito do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9080) expostas a diferentes concentrações de clorofilina e em diferentes exposições à luz (12 mW/cm²) após 24 horas de incubação

Tempo de exposição a luz (h)	100		50		10		5		2	
	mg/l x 10 ⁸	dv	mg/l x 10 ⁸	dv	mg/l x 10 ⁸	dv	mg/l x 10 ⁸	dv	mg/l x 10 ⁸	dv
0,00	28,78	0,026	28,13	0,084	30,77	0,068	30,32	0,021	30,65	0,036
0,50	10,00	0,038	19,21	0,093	11,21	0,021	16,13	0,027	29,00	0,060
1,00	2,29	0,052	1,45	0,000	4,97	0,000	6,29	0,022	27,26	0,015
2,00	1,49	0,020	1,07	0,031	1,86	0,024	2,83	0,079	3,00	0,087
3,00	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000
4,00	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000

Fonte: Elaborado pelos pesquisadores (2023).

Figura 4 – Efeito do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9080) expostas a diferentes concentrações de clorofilina e em diferentes exposições à luz (12 mW/cm²) após 24 horas de incubação



Fonte: Elaborado pelos pesquisadores (2023).

A partir dos dados obtidos foi possível calcular a dose letal de 50% (LD₅₀) como descrito na Tabela 2 e Figura 5. Os valores de LD₅₀ foram obtidos pelo tempo necessário de

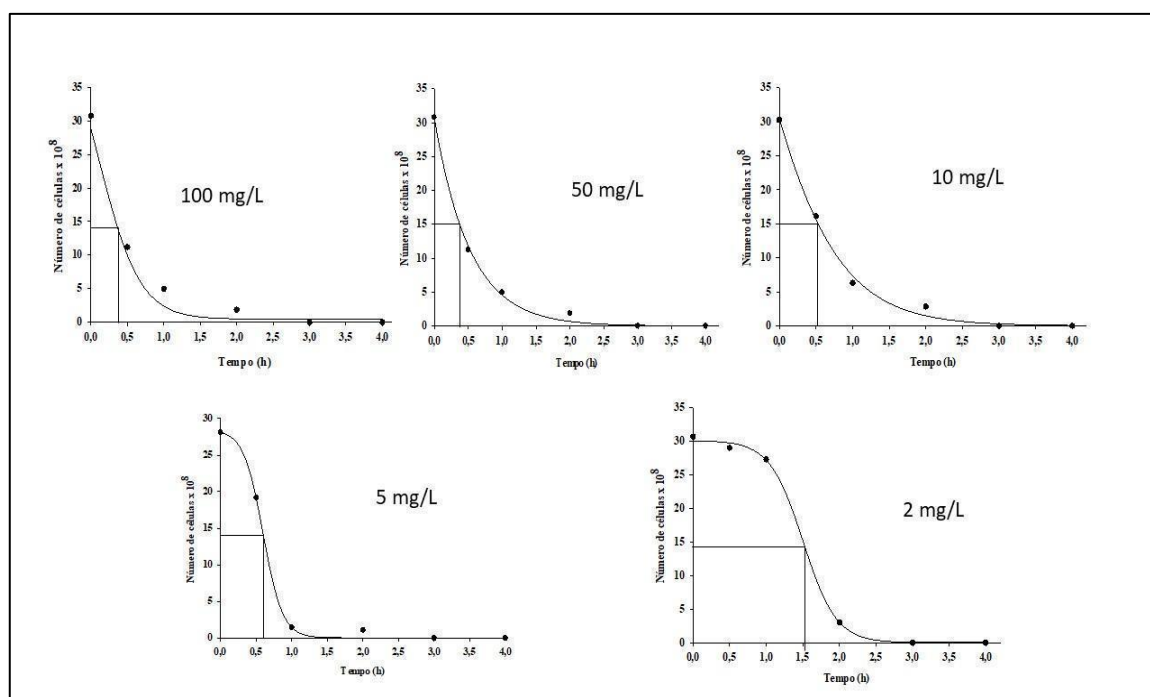
exposição de luz para apresentar efeito fotodinâmico no controle de crescimento. Nas concentrações de 5 a 10 mg/L de clorofilina obteve-se uma média de 29,50 ($\pm 4,89$) min para obter efeito no controle bacteriano. Para a concentração de 2 mg/L o efeito necessitou 90, 31 minutos de exposição. Na Figura 6 podemos observar uma linha quase constante entre as concentrações de 10 a 100 mg/L de clorofilina.

Tabela 2 – Valores de LD₅₀ obtidos em diferentes concentrações de clorofilina (2; 5; 10; 50 e 100 mg/L respectivamente) sobre diferentes tempos de exposição à luz de 12 mW/cm² da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9080).

Clorofilina (mg/L)	LD ₅₀ (min)	r ²	Normality Test (Shapiro- Wilk)	P
100,0	24,30	0,9978	0,8138	<0,0001
50,0	27,00	0,9990	0,8167	<0,0001
10,0	31,20	0,9978	0,8691	<0,0001
5,0	35,48	0,9955	0,918	<0,0001
2,0	90,31	0,9992	0,8996	<0,0001

Fonte: Elaborado pelos pesquisadores (2023).

Figura 5 – Determinação da dose letal (LD₅₀) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9080) de diferentes concentrações de clorofilina (2; 5; 10; 50 e 100 mg/L respectivamente) sobre diferentes tempos de exposição à luz de 12 mW/cm².

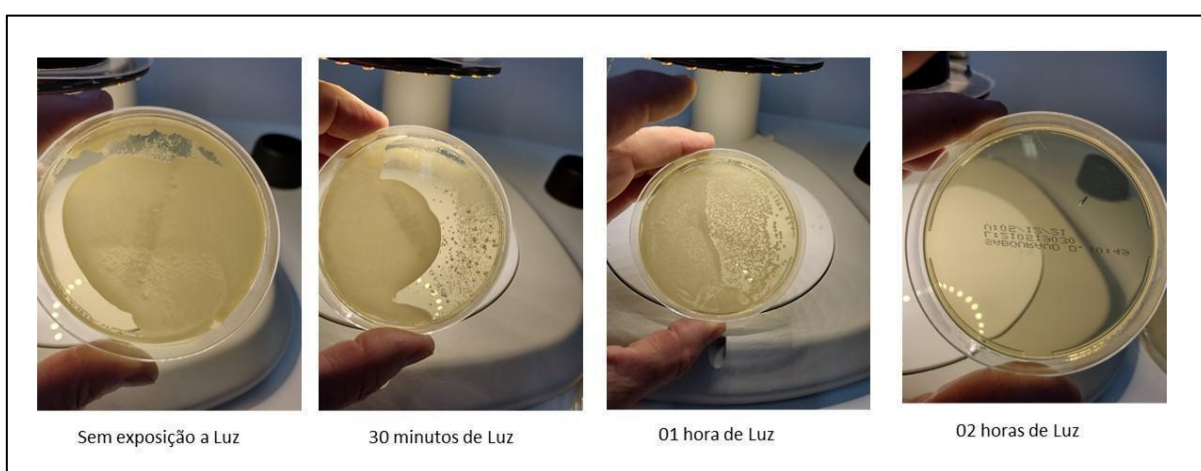


Fonte: Elaborado pelos pesquisadores (2023).

Após a exposição à luz foi realizada a semeadura para verificação da atividade fungicida ou fungistática, estas atividades dependem do tempo de exposição à luz e da

concentração de clorofilina utilizada. Na Figura 6 e na Figura 7, estão demonstrados os resultados destes experimentos. Nos ensaios abaixo de 05 mg/L de clorofilina foi observado um controle apenas bacteriostático. Nos experimentos acima de 5 mg/L de clorofilina o tempo de exposição menor do que duas horas não foram suficientes para causar a morte da levedura. Com duas horas a mais de exposição foi observado uma forte atividade bactericida, o que pode ser observado também nas concentrações de 50 e 100 mg/L de clorofilina. As concentrações de células no tempo duas horas observado na Tabela 1 podem ser do crescimento da levedura na fase exponencial antes do efeito fotodinâmico.

Figura 6 – Experimentos de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9080) cultivada em ágar Sabouraud por 24 h após diferentes tempos de exposição à luz com 10 mg/L de clorofilina.



Fonte: Acervo dos pesquisadores (2023).

Figura 7 – Experimentos de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9080) cultivada em ágar Sabouraud por 24 h após diferentes tempos de exposição à luz com 5 mg/L de clorofilina.



Fonte: Acervo dos pesquisadores (2023).

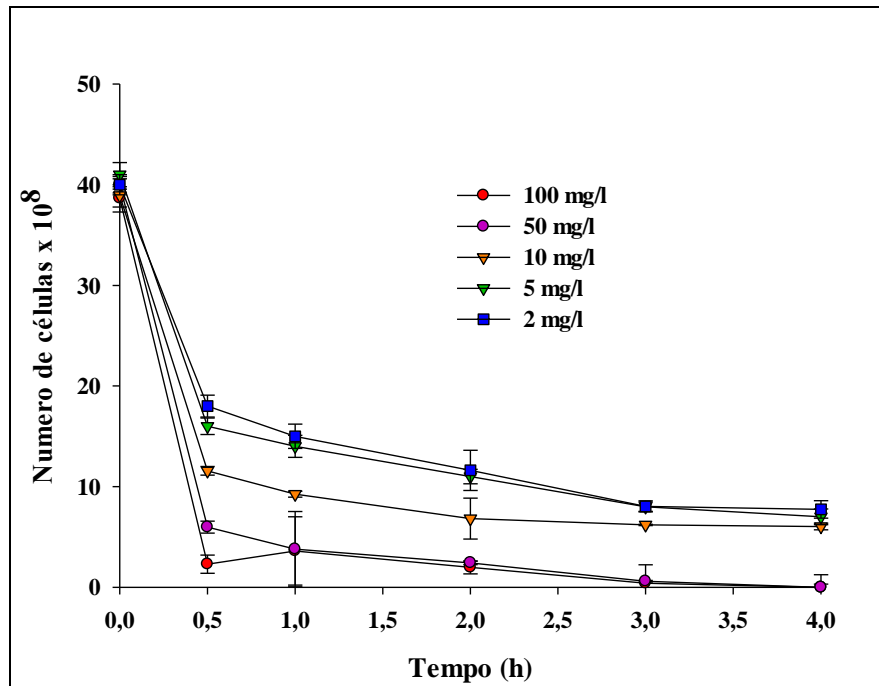
Para o segundo grupo de experimento foi utilizado a bactéria Gram positiva *S. aureus* (ATCC 6359). De mesma forma que fora observado nos experimentos anteriores a *S. aureus* respondeu positivamente para o controle fotodinâmico pela clorofilina. Os resultados obtidos estão descritos a seguir na Tabela 3 e Figura 8. Diferente dos resultados anteriores, a eficiência bactericida da ação fotodinâmica foi obtida em concentrações maiores acima de 50 mg/L de clorofilina e no mínimo de 3 horas de exposição frente à luz. A exposição à luz menor do que 3 horas apresentou uma inibição de crescimento do tipo fungiostático.

Tabela 3 – Efeito do crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 6359) expostas a diferentes concentrações de clorofilina e em diferentes exposições à luz (12 mW/cm²) após 24 horas de incubação

Tempo de exposição a luz (h)	100		50		10	5		2		
	mg/l x 10 ⁸	dv	mg/l x 10 ⁸	dv	mg/l x 10 ⁸	dv	mg/l x 10 ⁸	dv	mg/l x 10 ⁸	dv
0,00	38,68	0,8880	40,00	0,8196	38,94	1,6542	41,00	1,200	40,00	1,000
0,50	2,29	0,900	5,98	0,591	11,57	0,432	16,00	0,820	18,00	1,080
1,00	3,61	3,393	3,79	3,736	9,25	0,297	14,00	1,090	15,00	1,202
2,00	1,98	0,639	2,42	0,163	6,82	2,038	11,00	0,720	11,62	2,001
3,00	0,40	1,831	0,60	0,090	6,20	0,062	8,00	0,455	8,04	0,550
4,00	0,00	1,242	0,00	0,321	6,04	0,335	7,00	0,780	7,74	0,870

Fonte: Elaborado pelos pesquisadores (2023).

Figura 8 – Efeito do crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 6359) expostas a diferentes concentrações de clorofilina e em diferentes tempos de exposições à luz (12 mW/cm²) após 24 horas de incubação



Fonte: Elaborado pelos pesquisadores (2023).

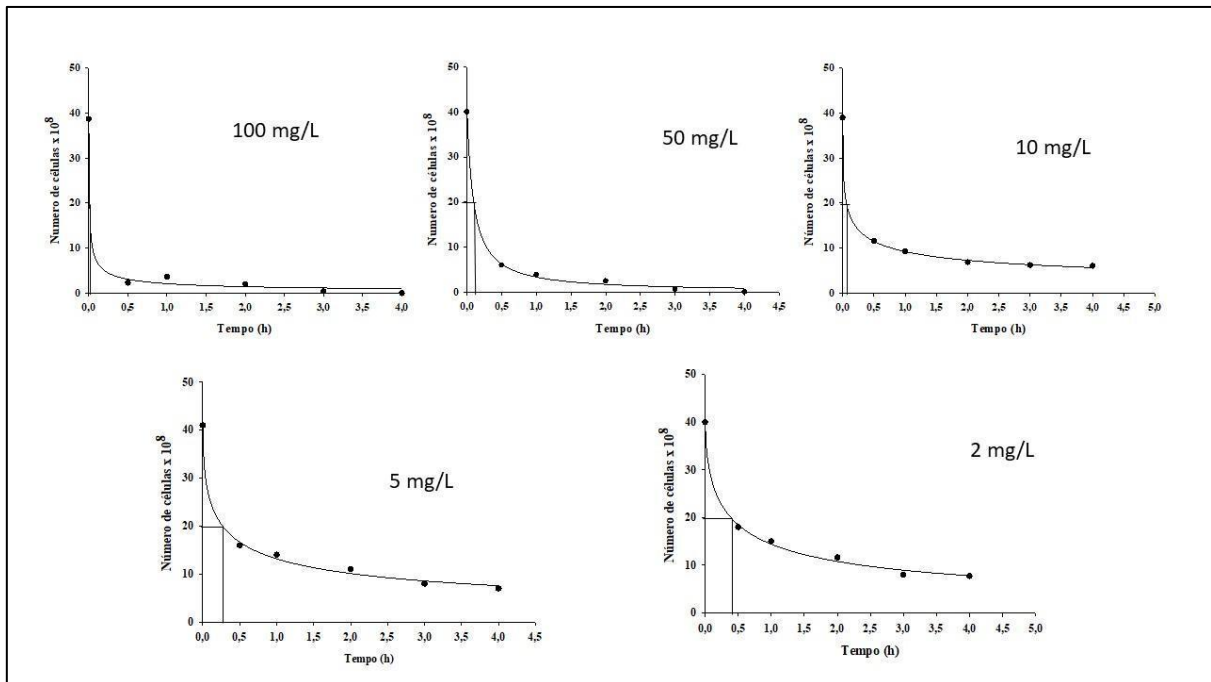
Em termos da necessidade de exposição à luz para se observar a atividade fotodinâmica da clorofila em termos da dose letal 50 (LD₅₀) ficou evidenciado a eficiência somente acima de 50 mg/L de clorofilina conforme se observa na Tabela 4 e Figura 9.

Tabela 4 – Valores de LD₅₀ obtidos em diferentes concentrações de clorofilina 2; 5; 10; 50 e 100 mg/L respectivamente) sobre diferentes tempos de exposição à luz de 12 mW/cm² da bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 6359)

Clorofilina (mg/L)	LD ₅₀ (min)	r ²	Normality Test (Shapiro-Wilk)	P
100,0	0,49	0,9960	0,8876	<0,0001
50,0	5,72	0,9985	0,9716	<0,0001
10,0	4,04	0,9993	0,9412	<0,0001
5,0	14,74	0,9947	0,8116	<0,0001
2,0	23,39	0,9952	0,9706	<0,0001

Fonte: Elaborado pelos pesquisadores (2023).

Figura 9 – Determinação da dose letal (LD₅₀) da bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 6359) de diferentes concentrações de clorofilina (2; 5; 10; 50 e 100 mg/L respectivamente) sobre diferentes tempos de exposição à luz de 12 mW/cm²



Fonte: Elaborado pelos pesquisadores (2023).

Conforme feito anteriormente, após os testes da atividade fotodinâmica foram feitas semeaduras para verificar a atividade bacteriostática ou bactericida, que é uma atividade dependente do tempo ou da concentração. Na Figura 10 está demonstrado o resultado destes experimentos. Em concentração acima de 50 mg/l de clorofilina e após três horas de exposição a luz foi apresentado uma ação fotodinâmica do tipo bactericida com a morte *S. aureus* (ATCC 6359) como demonstrado na Figura 10. As cepas de *S. aureus* (ATCC 6359) se mostram mais sensíveis em relação a atividade fotodinâmica, necessitando de menor exposição a luz para a ação da clorofilina quando comparada às cepas da levedura *S. cerevisiae* (ATCC 9080).

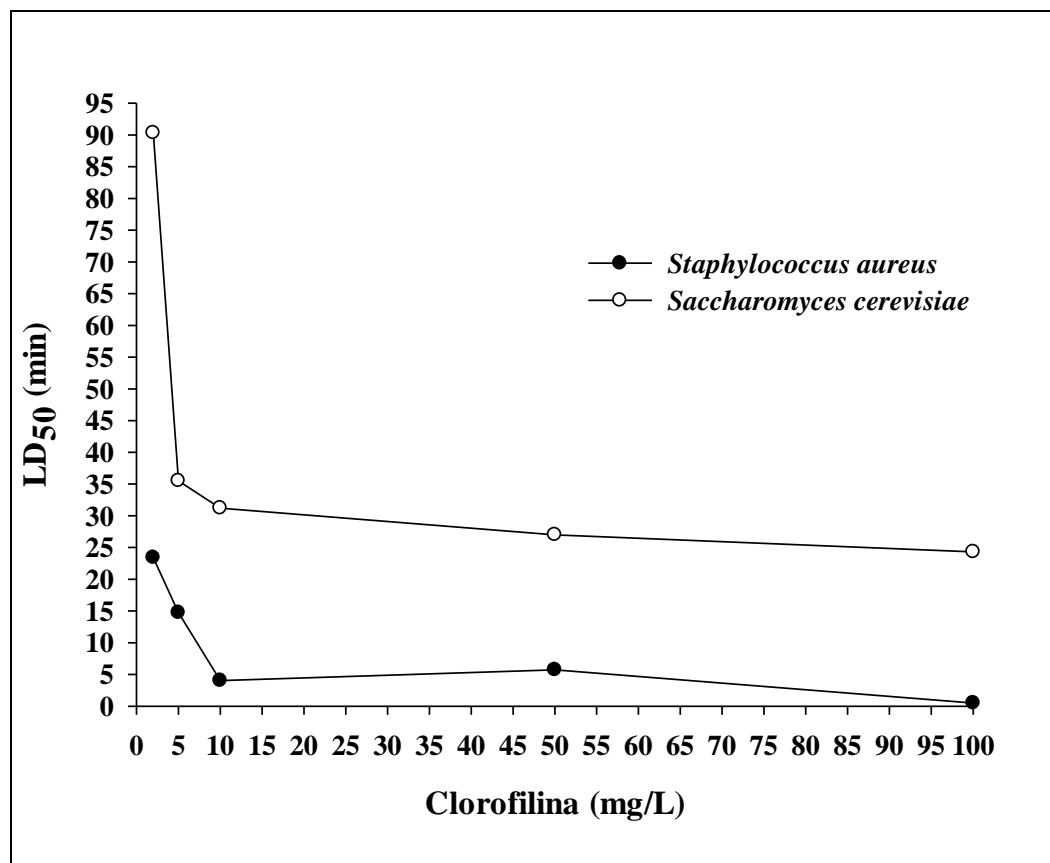
Figura 10 – Experimentos de crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 6359) cultivada em ágar BHI (LaborClin®) por 24 h após diferentes tempos de exposição à luz com 100 mg/L de clorofilina



Fonte: Acervo dos pesquisadores (2023).

Através dos dados obtidos foram comparados a eficiência da atividade fotodinâmica em termos da determinação do LD₅₀ entre a levedura *S. cerevisiae* cepa (ATCC 9080) e a bactéria Gram positiva *S. aureus* (ATCC 6359) descrito na Figura 11 e se observa um menor tempo necessário para atingir 50% de inibição do crescimento da *S. aureus* frente a ação da luz sobre a clorofilina.

Figura 11 – Relação da dose letal da exposição a luz (LD₅₀) em relação a concentração sob ação clorofilina na bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 6359) e na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9080)



Fonte: Elaborado pelos pesquisadores (2023).

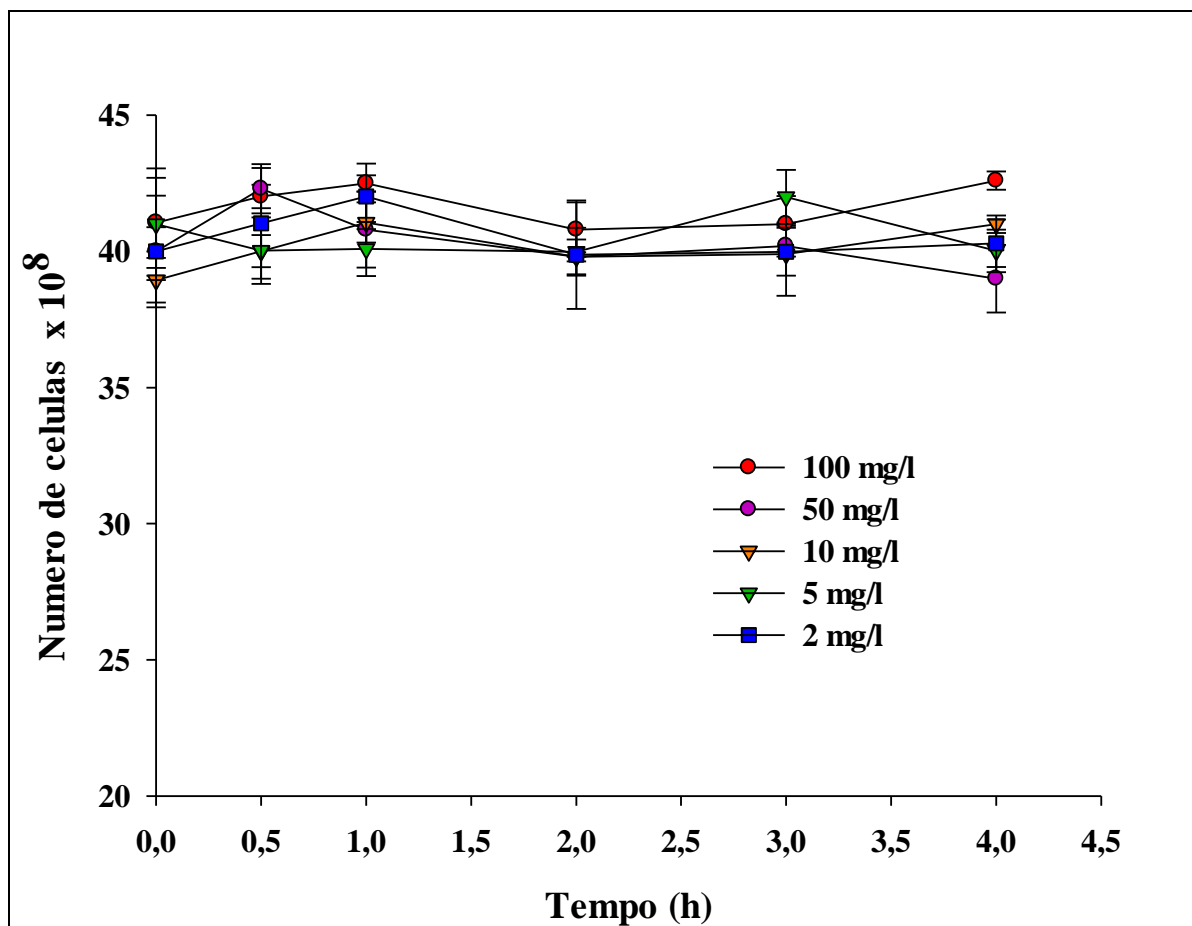
O terceiro grupo de experimento utilizou a bactéria Gram negativa *K. pneumoniae* KPC como descrito na Tabela 5 e Figura 12. Os resultados obtidos não demonstraram uma eficácia da atividade fotodinâmica sobre o crescimento, tanto bacterístico como bactericida da clorofilina frente a diferentes tempos de exposição a luz.

Tabela 5 – Efeito do crescimento da bactéria *Klebsiella pneumoniae* (KPC LBM 83) exposta a diferentes concentrações de clorofilina e em diferentes exposições à luz (12 mW/cm^2) após 24 horas de incubação

Tempo de exposição a luz	100		50		10		5		2	
	mg/l	dv	mg/l	dv	mg/l	dv	mg/l	dv	mg/l	dv
	$\times 10^8$		$\times 10^8$		$\times 10^8$		$\times 10^8$		$\times 10^8$	
0,00	41,05	1,6542	40,00	0,8880	38,94	0,8196	41,00	2,0500	40,00	2,0500
0,50	42,02	0,4323	42,30	0,9008	40,01	0,5910	40,03	1,2200	41,03	2,0300
1,00	42,50	0,2976	40,80	1,3936	41,06	0,7376	40,09	0,9900	42,02	1,2020
2,00	40,80	0,9990	39,80	0,6399	39,80	0,1639	39,99	0,8800	39,88	1,9900
3,00	41,00	0,0620	40,20	1,8313	39,90	0,0909	42,00	0,9900	39,99	0,8800
4,00	42,60	0,3354	39,00	1,2429	41,00	0,3219	40,02	0,7800	40,30	0,8700

Fonte: Elaborado pelos pesquisadores (2023).

Figura 12 – Efeito do crescimento da bactéria *Klebsiella pneumoniae* (KPC LBM 83) exposta a diferentes concentrações de clorofilina e em diferentes exposições à luz (12 mW/cm^2) após 24 horas de incubação



Fonte: Elaborado pelos pesquisadores (2023).

A possível diferença entre a atividade fotodinâmica entre os três microrganismos estudados está relacionado a parede celular e a característica da clorofilina ser hidrossolúvel. Segundo Salton (1963), as paredes das bactérias Gram-positivas são mais ricas em mucopeptídeos quando comparadas às bactérias Gram-negativas. Estes últimos são caracterizados por altos teores de lipídios. Ademais, as paredes das leveduras são ricas em complexos de polissacarídeos.

Diversos autores relatam que as bactérias gram-positivas geralmente são sensíveis à fotoinativação com fotossensibilizadores de porfirina e ftalocianina (KRÜGER *et al.*, 2019; MALIK; LADAN; NITZAN, 1992; MINNOCK *et al.*, 2000). Por outro lado, as bactérias gram-negativas foram relatadas como relativamente insensíveis. Enquanto os Gram-positivos estão rodeados por uma camada espessa e porosa de peptidoglicano, nas Gram-negativos a membrana externa complexa e impermeável com lipopolissacarídeos limita a entrada de aniônicos ou moléculas de carga neutra (MINNOCK *et al.*, 2000). Outro fator importante quando visam bactérias Gram-negativas porque essas células foram consideradas mais suscetíveis a $\bullet\text{OH}$ do que a do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (KRÜGER *et al.*, 2019).

Para terem atividade os fotossensibilizadores sejam administrados na presença de substâncias adicionais, por exemplo, CaCl_2 , Tris-EDTA ou polimixina B nonapeptídeo (PMBN), que alteram a permeabilidade da membrana externa. A insensibilidade das bactérias gram-negativas à fotoinativação foi atribuída à presença da membrana externa caracterizada pela dupla camada de lipídios, que diminui acentuadamente a permeabilidade da membrana para compostos grandes ou hidrofóbicos em comparação com as membranas biológicas usuais (KRÜGER *et al.*, 2019; VAARA, 1992).

A CH apresentou atividade fotodinâmica no controle da levedura *S. cerevisiae* semelhante à da bactéria *S. aureus*. Como demonstrado na Figura 12 as leveduras foram menos sensíveis do que a bactéria Gram negativa em termos do coeficiente LD_{50} , necessitando mais tempo de exposição à luz para obter efeito fotodinâmico. A sensibilidade à clorofilina pode ser explicada pela alta quantidade de açúcares da parede celular da levedura. De acordo com Ferracini-Santos e Sato (2009), a parede celular da levedura *S. cerevisiae* é organizada em duas camadas que são compostas por três macromoléculas principais: manana-proteína, um complexo no qual o polissacarídeo manana está covalentemente ligado à proteína; glucana, um polissacarídeo de β -1,3 e β -1,6 glicose e, quitina, um polímero de β -1,4 N-acetilglicosamina. Por outro lado, esta característica da parede da *S. cerevisiae* pode justificar uma menor sensibilidade à luz.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o atual estudo é possível demonstrar a ação da clorofilina frente a exposição da luz como inibidora do crescimento de *S. Cerevisiae*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*. Deste modo, foi possível testar a eficiência da CH quando exposta à luz de led para o controle das espécies estudadas. Sendo que é possível notar ainda, a ação eficiente da clorofilina, quando exposta à luz de led, podendo desta forma, confirmar a ação fotossensibilizadora deste derivado da clorofila. Adendo a isto, puderam ser analisados os efeitos bacteriostáticos e bactericidas, tendo em vista, que tais efeitos, dependem da concentração de clorofilina utilizada e do tempo de exposição à luz. Tal qual descrito pela literatura, as bactérias que possuem parede celular do tipo gram negativa não apresentaram resultado de inibição do crescimento. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram o potencial de controle de microrganismos semelhantes aos obtidos na literatura para outras espécies

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M. et al. *Staphylococcus aureus*. **Mostra Científica em Biomedicina**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2016.
- AMARAL, Rodrigo Rodrigues *et al.* Terapia fotodinâmica na endodontia - revisão de literatura. **Revista da Faculdade de Odontologia**, v. 15, n. 2, p. 207–211, 2010.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. Brasília: Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Prevenção de infecções por microorganismo multirresistentes em serviços de saúde**. Brasília: Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2021. Disponível em: www.gov.br/anvisa/pt-br. Acesso em: 28 nov. 2021.
- ARATO, Vanessa *et al.* Prophylaxis and Treatment against *Klebsiella pneumoniae*: Current Insights on This Emerging Anti-Microbial Resistant Global Threat. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, p. 1-51, 2021.
- ARAÚJO, A. V. de *et al.* Dormência tegumentar de sementes de baobá: Escarificação química. **Diversitas Journal**, v. 5, n. 2, p. 718–728, 6 abr. 2020.
- ARNOLD, Ryan S. *et al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC)-Producing Bacteria. **Southern Medical Journal**, v. 104, n. 1, p. 40-45, 2011.
- BALLÉN, Victoria *et al.* Antibiotic Resistance and Virulence Profiles of *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated From Different Clinical Sources. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 11, p. 1-11, 2021.
- BEZERRA, Luciana Cristina Nogueira de Moraes. **Processo rápido de obtenção de pão de forma com adição de extrato flavorizante natural**. 2021. 123 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.
- BRASÍLIA. **Decreto nº 9.902**, de 8 de julho de 2019. Altera o Anexo ao Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Lex: coletânea de legislação e jurisprudência, Brasília, 2019.
- BRATTI, Vinícius Muller. **Análise de Risco em Microcervejarias**: um estudo de caso em uma cervejaria artesanal no sul catarinense. 2018. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Segurança do Trabalho) - Universidade do Sul de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.
- CARRERA, Santiago Cadena. **Validação do processo CIP como ferramenta para melhorar a qualidade e a produtividade**: estudo de caso em microcervejaria. 2015. 108 f. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.
- CAVALLINI, Grasielle Soares *et al.* Utilização do ácido peracético na desinfecção de esgoto sanitário: uma revisão. **Semina: ciências exatas e tecnológicas**, v. 33, n. 1, p. 27-40, 2012.

CERVBRASIL – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DA CERVEJA. **Anuário 2016**. São Paulo, 2016.

CHEVRETTE, Marc G. *et al.* The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2019.

CHAGAS, Rodrigo Altoé. **Efeito de concentração subterapêutica de vancomicina sobre *Staphylococcus aureus*, no contexto do tratamento de bacteremias no paciente em hemodiálise**. 2016. 75 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2016.

CHOO, Eun Ju; CHAMBERS, Henry F. Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. **Infect Chemother**, v. 48, n. 4, p. 267-76, 2016.

COUTINHO, Carlos Alberto Tavares; QUINTELLA, Carlos Alberto Silva; PANZANI, Márcio Maso. 2020. **A História da Cerveja no Brasil**. Disponível em: <https://www.cervesia.com.br/artigos-tecnicos/cerveja/historia-da-cerveja/2-a-historia-da-cerveja-no-brasil.html>. Acesso em: 05 dez. 2021.

CUNHA, Vinícius de Oliveira. **Bactérias Multirresistentes *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* – ENZIMA KPC nas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS)**. 2014. 55 f. Monografia (Especialização em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

ERZINGER, Gilmar Sidnei *et al.* Optimizing conditions for the use of chlorophyll derivatives for photodynamic control of parasites in aquatic ecosystems. **Parasitology Research**, v. 109, n. 3, p. 781–786, 2011.

ERZINGER, Gilmar Sidnei *et al.* Assessment of the impact of chlorophyll derivatives to control parasites in aquatic ecosystems. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 4, p. 949–958, 2015.

FACCIN, Lígia Carla *et al.* Clorofilina inibe a multiplicação de poliovírus em cultura de células HEp-2. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 75-82, 2008.

FARIA, Rafael César Bolleli. **Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus***. 2008. 48 f. Dissertação (Pós-graduação em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

FERRACINI-SANTOS, Luciana; SATO, Hélia Harumi. Isolamento de polímeros da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e avaliação da atividade antioxidante da manana-proteína isolada. **Química nova**, v. 32, p. 322-326, 2009.

FLORA, Martina *et al.* *Staphylococcus aureus* in chronic airway diseases: An overview. **Respiratory Medicine**, v. 155, p. 66-71, 2019.

GARCIA, Josefa Vanicleide Alves dos Santos; COMARELLA, Larissa. O Uso Indiscriminado de Antibióticos e as Resistências Bacterianas. **Caderno Saúde e Desenvolvimento**, v. 10, n. 18, p. 78-87, 2021

GELATTI, Luciane Cristina *et al.* *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 501-506, 2009.

GHORBANI, Jaber *et al.* Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an

- overview. **Laser Therapy**, v. 27, n. 4, p. 293–302, 2018.
- GIGUÈRE, Steeve; PRESCOTT, John F.; DOWLING, Patricia M. **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 5. Ed. Nova Jersey: Wiley, 2013.
- GOFFEAU, André. *et al.* Life With 6000 Genes. **Science**, v. 274, p. 546–567, 1996.
- HA, Chang Hoon. *et al.* Analysis of alkali-soluble glucan produced by *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and mutants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 370–377, 2002.
- ISSA, Maria Cláudia Almeida; MANELA-AZULAY, Mônica. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501-11, 2010.
- JACKSON, Zachary *et al.* Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial agent. **Lasers in Medical Science**, v. 14, n. 2, p. 150–157, 1999.
- JENUL, Christian; HORSWILL, Alexander R. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 2, p. 1–21, 2019.
- KARAIKOS, Ilias *et al.* Carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*: implication on future therapeutic strategies. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 20, p. 53-69, 2021.
- KRÜGER, Marcus *et al.* What an *Escherichia coli* mutant can teach us about the antibacterial effect of chlorophyllin. **National Library of Medicine: Microorganisms**, v. 7, n. 2, p. 01-23, 2019.
- LITI, Gianni. The fascinating and secret wild life of the budding yeast *S. cerevisiae*. **eLife**, v. 4, p. 1–9, 2015.
- MACHADO, Antonio Eduardo da Hora. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. p. 237-243, 2000.
- MAGIORAKOS, Anna Pelagia *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.
- MALIK, Zvi; LADAN, Hava; NITZAN, Yeshayahu. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 14, n. 3, p. 262-266, 1992.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Anuário da Cerveja 2020**. Brasília: [s. n.], 2021.
- MARTIN, Rebeca M.; BACHMAN, Michael A. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 8, n. 4, n. p., 2018.
- MATTOS, Ivanildo Luiz de *et al.* Peróxido de Hidrogênio: importância e determinação. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 373–380, 2003.
- MEYER, Sheila Telles. O Uso de Cloro na Desinfecção de Águas, a Formação de Trihalometanos e os Riscos Potenciais à Saúde Pública. **Caderno Saúde Pública**, v. 10, n. 1, p. 99–110, 1994.

- MINNOCK, Andrew *et al.* Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 522-527, 2000.
- MONTENEGRO, Karen Pequeno Brasil. **Viabilidade de produção de cerveja artesanal utilizando *Saccharomyces boulardii***. 2017. 55 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Bacharelado em Biotecnologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.
- NOGUEIRA, Alexandre Verzani; SILVA FILHO, Germano Nunes. **Microbiologia**. Florianópolis: CED/LANTEC/UFSC, 2015.
- OCTAVIA, Sophie; LAN, Ruiting. The Family Enterobacteriaceae. *In*: ROSENBERG, Eugene *et al.* (eds). **The Prokaryotes**. Springer: Berlin, Heidelberg, 2014.
- OLIVEIRA, Renan Crisóstomo de. **Processo de Reprodução, Limpeza e Sanitização da Cervejaria Bacurim**. 2019. 23 f. Relatório de estágio (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2019.
- OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance**. OMS: França, 2014.
- OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. 2017. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed**. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Acesso em: 03 dez. 2021.
- PARAPOULI, Maria *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. **AIMS Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1-31, 2020.
- PONTES, Monalisa de Menezes. **Análise técnico-econômica de uma fábrica de aguardente composta por caldo de cana e polpa de acerola**. 2021. 89 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.
- PORRA, Robert John; THOMPSON, William A.; KRIEDEMANN, Paul E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 975, p. 384-90, 1989.
- PORRA, Robert John. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. **Photosynthesis Research**, v. 73, n. 3, p. 149-56, 2002.
- PRINCE, Simon E. *et al.* *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*. **Heart & Lung: The Journal of Cardiopulmonary and Acute Care**. v. 26, n. 5, p. 413-7, 1997.
- RICHTER, Peter Rolf *et al.* Chlorophyllin as a possible measure against vectors of human parasites and fish parasites. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, p. 1–6, 2014.
- RICHTER, Peter Rolf *et al.* Using colistin as a trojan horse: inactivation of gram-negative bacteria with chlorophyllin. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, p. 1–22, 2019.
- ROCHA, Maithon Mareco. **Avaliação de clorofilina cúprica de sódio como agente**

fotosensibilizador para o controle de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). 2017. 78 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2017.

RODRIGUES, Tábata Natasha Almeida *et al.* Carcinoma basocelular desenvolvido sobre nevo sebáceo: tratamento com terapia fotodinâmica abordando campo de cancerização. **Surgical & Cosmetic Dermatology**. v. 9, n. 1, p. 100–103, 2017.

ROSALIN, João Paulo. A Trajetória da Cerveja no Brasil: Uma Proposta de Aproximação com a Teoria da Sucessão dos Meios Geográficos. **Geografia**. v. 27. n. 1. p. 149 – 165, 2021.

SALTON, Milton R. J. The relationship between the nature of the cell wall and the Gram stain. **Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 223-235, 1963.

SANTOS, Neusa de Queiroz. A Resistência Bacteriana no Contexto da Infecção Hospitalar. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 13, p. 64–70, 2004.

SANTOS, André Luis dos *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.

SCUDIERO, Olga *et al.* Human defensins: a novel approach in the fight against skin colonizing *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics**, v. 9, n. 4, p. 1-38, 2020.

SEIBERT, Gabriela *et al.* Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* producing enterobacteria in a teaching hospital. **Einstein**, v. 12, n. 3, p. 282-286, 2014.

SILVA, Benjamim Henrique de Lima; MELO, Marcos Aurélio Bezerra de. Trihalometanos em água potável e riscos de câncer: Simulação usando potencial de interação e transformações de Bäcklund. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 309–315, 2015

SILVA, Eliana Lacerda da *et al.* *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC): bactéria multirresistente a antibióticos. **Revista Brasileira Interdisciplinar de Saúde**. v. 1, n.1, p. 62-66, 2019.

SILVA, Daiane Vaneci *et al.* *Klebsiella pneumoniae* causing mass mortality in juvenile Nile tilapia in Brazil: Isolation, characterization, pathogenicity and phylogenetic relationship with other environmental and pathogenic strains from livestock and human sources. **Aquaculture**, v. 546, p. 737-376, 2022a.

SILVA, Rafael Nakamura *et al.* *Klebsiella pneumoniae* multirresistente: um estudo retrospectivo em Manaus, Brasil. **Archives of Microbiology**, v. 204, n.4, p. 1-8, 2022b.

SIMÕES, Thamyres Maria Silva *et al.* Aplicabilidade da terapia fotodinâmica antimicrobiana na eliminação do *Enterococcus faecalis*. **Archives of Health Investigation**, v. 7, n. 11, p. 492–496, 2019.

SIWCZAK, Fatina *et al.* Human macrophage polarization determines bacterial persistence of *Staphylococcus aureus* in a liver-on-chip-based infection model. **Biomaterials**, v. 287, 1-12, 2022.

SOUZA, Rozeli do Prado *et al.* A atenção farmacêutica no uso racional de antibióticos: uma revisão narrativa. **Revista Artigos.com**, v. 26, p. 1-9, 2021.

STREIT, Nivia Maria *et al.* As clorofilas. **Revista Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748-55, 2005.

TAYLOR, Tracey A.; UNAKAL, Chandrashekar G. *Staphylococcus aureus*. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

TEODORO, Paulo de Souza; FERNANDES, Hugo Victor dos Santos. O uso da terapia fotodinâmica como método alternativo de tratamento da candidíase oral. **Revista Arquivos Científicos**. v. 3, n. 1, p. 14-23, 2020.

TUFFS, Stephen W. *et al.* Superantigens promote *Staphylococcus aureus* bloodstream infection by eliciting pathogenic interferon-gamma production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 119, n. 8, p. 1-11, 2022.

VAARA, Martti. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **National Library of Medicine: Microbiological reviews**, v. 56, n. 3, p. 395-411, 1992.

WOHLLEBE, Stephanie *et al.* Photodynamic treatment of *Chaoborus crystallinus* larvae with chlorophyllin induces necrosis and apoptosis. **Photochemistry and Photobiology**. v. 87, n. 5, p. 1113-22, 2011.

YIGIT, Hesna *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 4, p. 1151-61, 2001.

ZWACK, Erin E. *et al.* *Staphylococcus aureus* induces a muted host response in human blood that blunts the recruitment of neutrophils. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 119, n. 31, p. 1-11, 2022.

ANEXO A – Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações**Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações**

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação, autorizo a Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) a disponibilizar em ambiente digital institucional, Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/IBICT) e/ou outras bases de dados científicas, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o texto integral da obra abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data 01/07/2023.

1. Identificação do material bibliográfico: () Tese (X) Dissertação () Trabalho de Conclusão

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Autor: LUAN GESSER RODRIGUES

Orientador: PROF. DR. GILMAR SIDNEI ERZINGER

Coorientador: PROF. DR. SEBASTIAN MICHAEL STRAUCH

Data de Defesa: 17/03/2023

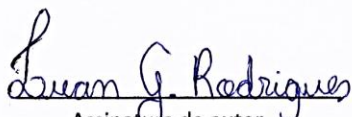
Título: CONTROLE FOTOBIOLOGICO POR CLOROFILINA EM CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9080), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6359) E *Klebsiella pneumoniae* (KPC LBM 83).

Instituição de Defesa: UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE

3. Informação de acesso ao documento:

Pode ser liberado para publicação integral (X) Sim () Não

Havendo concordância com a publicação eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese, dissertação ou relatório técnico.


Assinatura do autor

Joinville, 07/06/2023

Local/Data