

JULIANO FERREIRA BARBOSA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTODINÂMICO DE CLOROFILINA E LÚPULO
NO CONTROLE ANTIMICROBIANO DE CEPAS DE *KLEBSIELLA
PNEUMONIAE* E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

**JOINVILLE
2020**

JULIANO FERREIRA BARBOSA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTODINÂMICO DE CLOROFILINA E LÚPULO
NO CONTROLE ANTIMICROBIANO DE CEPAS DE *KLEBSIELLA
PNEUMONIAE* E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville. Área de Concentração Saúde. Orientador: Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger. Coorientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França.

**JOINVILLE
2020**

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

B238a Barbosa, Juliano Ferreira
Avaliação do efeito fotodinâmico de clorofilina e lúpulo no controle antimicrobiano de cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* / Juliano Ferreira Barbosa; orientador Dr. Gilmar Sidnei Erzinger; coorientador Dr. Paulo Henrique Condeixa de França. – Joinville: UNIVILLE, 2020.

49 f.: il. ; 30 cm

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

1. Bacteriologia médica. 2. Fotoquimioterapia. 3. Humulus. 4. *Staphylococcus aureus* Resistente à Metilina. 5. *Klebsiella pneumoniae*. I. Erzinger, Gilmar Sidnei (orient.). II. França, Paulo Henrique Condeixa de (coorient.). III. Título.

CDD.616.014


Termo de Aprovação

“Avaliação do Efeito Fotodinâmico de Clorofilina e Lúpulo no Controle Antimicrobiano contra Cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*”

por

Juliano Ferreira Barbosa


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.

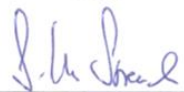

Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger
Orientador (UNIVILLE)


Profa. Dra. Marta Jussara Cremer
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger
Orientador (UNIVILLE)


Prof. Dr. Alessandro Conrado de Oliveira Silveira
(FURB)


Prof. Dr. Sebastian Michael Strauch
(UNIVILLE)


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

Joinville, 15 de dezembro de 2020

Dedico cada esforço, palavra e experimento deste estudo aos que o tornaram possível. À sabedoria, amor e ao universo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu orientador, professor Gilmar S. Erzinger e coorientador, professor Paulo H. C. de França pela grande oportunidade de poder ir à busca do conhecimento científico, pelo apoio logístico e financeiro e por tornar possível a conquista de algo tão desejado.

Aos meus pais, meu porto seguro e minha base, que desde o início me incentivaram, apoiaram, investiram e foram extremamente compreensíveis com essa etapa tão importante da minha vida. Dois seres indescritivelmente batalhadores, foi graças a vocês que cheguei aqui.

Aos meus dois irmãos que tenho orgulho das pessoas incríveis que são, o amor de vocês é a força que me motiva a ser cada dia melhor.

Ao meu namorado Jonatan, te agradeço por estar ao meu lado todos os dias construindo uma história juntos em meio às aflições, medos e ansiedade. Meu conforto, abraço amigo, meu companheiro!

Imensamente grato ao Dr. Sebastian M. Strauch por toda a assistência no decorrer da pesquisa, suporte, direcionamento, expertise transmitida e tamanha paciência frente a tantos eventos desafiadores.

Ao Laboratório Ghanem (DASA) pelo auxílio a pesquisa, flexibilidade e reconhecimento.

Aos meus colegas de turma do MSMAXVII que tive o prazer de conhecer, profissionais de tamanha competência procurando por mais sabedoria. Especialmente aos meus amigos Michelli, Karla e Eduardo, que compartilhamos risadas e angústias, guardo vocês em meu coração.

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”

(Cora Coralina)

RESUMO

A presença de microrganismos multidroga-resistentes (MDR) vem crescendo e se tornando um grande problema de saúde pública global, motivando a procura por terapias alternativas a antibioticoterapia. Neste sentido, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) surge como um método excepcional, sendo baseada na excitação de um fotossensibilizador (FS) irradiado por luz, que por consequência gera espécies reativas de oxigênio (EROS) causando a morte celular bacteriana e impossibilitando o desenvolvimento de resistência. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito fotodinâmico dos FSs clorofilina (CHL) e lúpulo (LUP), expostos a luz de LED, no controle antimicrobiano sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Foram utilizadas 4 cepas ATCC, sendo elas *K. pneumoniae* ATCC 700603, KPC ATCC BAA-1705, *S. aureus* ATCC 29213 e MRSA ATCC BAA-1026, onde foram submetidas a condição experimental através do método de microdiluição em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e posterior contagem de UFC/mL. Foi evidenciada uma intensa sensibilização para as cepas de *S. aureus* e MRSA quando associada CHL ao LED, mostrando total inibição bacteriana. Para as bactérias Gram-negativas, apesar de terem expressado potencial antimicrobiano, o efeito fotodinâmico não foi tão significativo. Faz-se necessária a elaboração de estudos utilizando moléculas desestabilizadoras de membranas de bactérias Gram-negativas bem como da procura de novos métodos para o aperfeiçoamento de preparações de lúpulo com o objetivo de elucidar sua utilidade na terapia fotodinâmica.

Palavras-Chave: aPDT, Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, MDR, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, Clorofilina, Lúpulo, KPC, MRSA.

ABSTRACT

The presence of multidrug-resistant microorganisms (MDR) has been growing and becoming a major global public health problem, motivating a search for alternative therapies for antibiotic therapy. In this sense, antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) appears as an exceptional method, based on the excitation of a photosensitizer (PS) irradiated by light, which consequently generates reactive oxygen species (ROS) causing bacterial cell death and making the development of resistance impossible. This study aimed to evaluate the photodynamic effect of chlorophyllin (CHL) and hop as PSs, exposed to LED-light, in the antimicrobial control of *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* strains. Four ATCC strains were used, *K. pneumoniae* ATCC 700603, KPC ATCC BAA-1705, *S. aureus* ATCC 29213 and MRSA ATCC BAA-1026, where they were submitted to experimental condition using the BHI (Brain Heart Infusion) broth microdilution method and subsequent CFU/mL count. An intense sensitization was evidenced for the strains of *S. aureus* and MRSA when associated with CHL, showing total bacterial inhibition. For Gram-negative bacteria, despite having expressed antimicrobial potential, the photodynamic effect was not so significant. It is necessary to elaborate studies using destabilizing molecules of Gram-negative bacteria's membranes, as well as the search for new methods for the improvement of preparations of hop to elucidate a usefulness in photodynamic therapy.

Key words: aPDT, Antimicrobial Photodynamic Therapy, MDR, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, Chlorophylline, Hop, KPC, MRSA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- $^1\text{O}_2$ – Oxigênio singleto
- ABS – Absorbância
- AC-MRSA – MRSA adquirido na comunidade
- aPDT – Antimicrobial Photodynamic Therapy
- ATCC – American Type Culture Collection
- BHI – Brain Heart Infusion
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention
- CHL – Clorofilina
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- CO_2 – Dióxido de carbono
- CRE – Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae
- CTI – Centro de Terapia Intensiva
- DO – Densidade óptica
- DP – Desvio padrão
- EDR – Extensivamente Droga-resistente
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EROS – Espécies reativas de oxigênio
- ESBL – Betalactamases de Espectro Estendido
- EUA – Estados Unidos da América
- FS – Fotossensibilizador
- IMP – Imipenemase
- IRAS – Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
- KOH – Hidróxido de potássio
- KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
- LED – Diodo Emissor de Luz
- LPL – Lúpulo
- MBL – Metalo-betalactamase
- MDR – Multidroga-resistente
- MgCO_3 – Carbonato de magnésio
- MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina
- NaCl – Cloreto de sódio
- NDM – New Delhi Metalo-betalactamase

OH • - Radical superóxido

OMS – Organização Mundial da Saúde

ONU – Organização das Nações Unidas

OXA – Oxacilinases

PBP – Proteína de ligação à penicilina

PBP2a – Proteína alterada de ligação à penicilina

PDR – Pandroga-resistente

SCC*mec* – Staphylococcal cassette chromosome *mec*

SPM – São Paulo metalo-betalactamase

VIM – Verona imipenemase

VRE – Enterococos resistente à vancomicina

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Classificação de Ambler.....	19
Figura 2 - Mecanismo da terapia fotodinâmica.....	21
Figura 3 - Estrutura química clorofilina.....	22
Figura 4 - Corte transversal da flor fêmea de lúpulo.....	24
Figura 5 - Estrutura química dos principais α -ácidos do lúpulo.....	25
Figura 6 - Estrutura química dos principais β -ácidos do lúpulo.....	25
Figura 7 - Espectro da lâmpada	30
Figura 8 - FSs clorofilina e lúpulo em microplacas.....	31
Figura 9 - Estufa microbiológica adaptada com LED.....	32
Gráfico 1 - Efeito da clorofilina (CHL) em <i>K. pneumoniae</i> e KPC.....	35
Gráfico 2 - Efeito da clorofilina (CHL) em <i>S. aureus</i> e MRSA.....	36
Gráfico 3 - Correlação da concentração microbiana e clorofilina ideal para aPDT.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das plantas utilizadas no experimento.....	29
Tabela 2 - Esquema do experimento de microdiluição em caldo BHI.....	30
Tabela 3 - Médias de UFC/mL obtidas nos diferentes grupos experimentais das cepas utilizadas.....	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA	18
3.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA EM GRAM NEGATIVOS	19
3.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA EM GRAM POSITIVOS	21
3.4 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT)	22
3.5 CLOROFILINA	24
3.6 LÚPULO.....	25
4 METODOLOGIA	29
4.1 DESENHO DO ESTUDO	29
4.2 AMOSTRAS.....	29
4.3 SUSPENSÃO BACTERIANA	29
4.4 FOTOSSENSIBILIZADORES	29
4.4.1 Extração e padronização de clorofilina	30
4.4.2 Extração e padronização de lúpulo.....	31
4.5 FONTE DE LUZ	31
4.6 AÇÃO FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT)	32
4.6.1 Microdiluição em caldo	32
4.7 DESCARTE DO MATERIAL	34
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

A presença de microrganismos multidroga-resistentes (MDR) vem se tornando cada vez mais desafiadora no âmbito da saúde. Tendo em vista de que a crescente resistência bacteriana é considerada como um problema de saúde pública global, segundo relatório *Frontiers* de 2017 da Organização das Nações Unidas (ONU), é perceptível a preocupante dimensão em que o comprometimento à efetividade dos antibióticos vem proporcionando, deixando muitas vezes inviável até mesmo o tratamento de uma simples infecção (UNEP, 2017).

Willyard (2017) cita a estimativa de que anualmente cerca de 700 mil pessoas evoluem a óbito por motivos de infecção por bactérias resistentes a antibioticoterapia. Isto é decorrente de uma série de fatores, a começar da própria composição da parede celular, onde por exemplo em bactérias gram-negativas há a presença de uma dupla camada, o que dificulta a entrada de drogas em concentrações suficientemente altas para matá-las. Além disso, há a presença de mecanismos e genes de resistência e um aumento da presença de mutações genéticas que elas vêm desenvolvendo (ANVISA, 2007; HONG *et al.*, 2015).

A partir do cenário alarmante acerca da busca por opções terapêuticas eficazes e a alta taxa de cepas resistentes à antibióticos, a Organização Mundial da Saúde (OMS), no início de 2017, classificou bactérias resistentes como de prioridade crítica, alta e média. Desta forma, no que concerne à demanda do desenvolvimento de novos antibióticos e meios para reduzir essa resistência, foram destacadas as bactérias da família *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos e *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA), respectivamente, como de crítica e alta urgência frente às infecções hospitalares, atualmente denominadas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) (WILLYARD, 2017; BRASIL, 1997).

Infecções causadas por bactérias gram-negativas e positivas, especificamente por *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, vem apresentando uma grave ameaça à saúde de pacientes hospitalizados, sendo uma das principais causas de IRAS, sobretudo em Centros de Terapia Intensiva (CTIs). É notável uma ascendente prevalência de resistência nessas bactérias em todo o mundo, principalmente no

Brasil (SILVA *et al.*, 2014; HONG *et al.*, 2015; VAN DUIN; DOI, 2017; LAHKUNDI; ZHANG, 2018). Em virtude da limitação na terapia atualmente disponível, é de sumo interesse a realização de estudos para melhor analisar a oferta de meios efetivos para o tratamento contra estes microrganismos MDR.

Na busca pela inovação terapêutica e por métodos eficazes que contribuam para saúde de indivíduos enfermos, muito têm-se discutido a respeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, do inglês Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) (AMINA; KADUSKAR, 2018). É uma terapia alternativa que abrange desde as áreas clínicas oncológica, dermatológica e antimicrobiana com a ideia de ser uma intervenção baseada em moléculas fotossensibilizadoras (FS) que geram espécies reativas de oxigênio, onde induzem a destruição das células-alvo à morte celular quando irradiadas com luz em comprimento de onda e dose adequada (HAMBLIN; HASAN, 2004; PÉREZ *et al.*, 2018; HU *et al.*, 2018; DE SANTI *et al.*, 2018).

Apesar de serem desenvolvidas pesquisas que avaliem a ação fotodinâmica de variados FSs contra microrganismos, ainda há a necessidade da elucidação do potencial que substâncias naturais podem ajudar na corrida contra a multirresistência. Isto possibilita a formulação de uma futura estratégia para poder melhor controlar bactérias MDR, por exemplo, além de diminuir gastos de saúde pública. Neste sentido, a compreensão dos benefícios que a aPDT pode oferecer, associada a FSs como clorofilina e lúpulo, se faz de grande importância para o combate de bactérias Gram-negativas e positivas, como *K. pneumoniae* e *S. aureus*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito fotodinâmico de clorofilina e lúpulo no controle antimicrobiano sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar a eficácia na utilização de diodo emissor de luz (LED) associada a clorofilina e lúpulo.
- Explorar quais concentrações de clorofilina e lúpulo são capazes de inativar as cepas bacterianas *K. pneumoniae*, KPC, *S. aureus* e MRSA.
- Investigar a ação antimicrobiana da fototerapia em conjunto do fotossensibilizador clorofilina e lúpulo em cepas resistentes do tipo KPC e MRSA, comparada às estirpes sensíveis de *K. pneumoniae* e *S. aureus*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA

Com a descoberta da penicilina, em 1928, e o seu desenvolvimento como agente terapêutico, em 1942, observou-se uma redução significativa das infecções estreptocócicas dos pacientes hospitalizados (OLIVEIRA *et al.*, 1998). Porém, na década de 50 houve um aumento da incidência de IRAS devido ao surgimento de cepas de *Staphylococcus* resistentes à penicilina, causando surtos de infecções com altas taxas de mortalidade (CHAMBERS, 1988).

No início da última década muito foi questionado sobre a definição de bactéria multirresistente, tendo em vista das variadas classificações e descrições citadas na literatura biomédica a respeito dos diferentes microrganismos MDR encontrados (MAGIORAKOS *et al.*, 2012). Procurando por uma terminologia internacional padronizada, especialistas levantaram tamanha necessidade dessa iniciativa, indicando o impacto que essas definições poderiam refletir em dados de vigilância epidemiológica na saúde pública e na confiabilidade destes (TAPSALL *et al.*, 2009). Magiorakos *et al.* (2012) além de contextualizarem o cenário, citando outros conceitos diferentes de resistência microbiana como Extensivamente Droga-resistente (EDR) e Pandroga-resistente (PDR), pontuam a definição de MDR como a não-susceptibilidade a pelo menos um agente em três ou mais categorias de antimicrobianos às quais as bactérias são habitualmente sensíveis. A multirresistência bacteriana constitui o fator básico que gera contratempos à eficácia futura dos novos antimicrobianos e que justifica a investigação e produção de novas drogas. No entanto, a pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos não conseguem conter a resistência bacteriana, porque esta eclode com muito mais agilidade e eficácia (SANTOS, 2004).

O surgimento da resistência antimicrobiana é, geralmente, relacionado como uma consequência natural da “pressão seletiva” resultante do uso apropriado ou não de antibióticos. Esta pressão seletiva pode resultar na produção de cepas previamente suscetíveis que adquiriram resistência após contato com alguma droga, como no caso de *Enterococcus* em relação à vancomicina, caracterizando a resistência adquirida (de SOUZA, 2013). Pode também ser o resultado da emergência de cepas naturalmente resistentes a determinados antibióticos, como a *Stenotrophomonas*

maltophilia em relação ao imipenem induzido por uma resistência intrínseca (POSSEBON, 2003). Por outro lado, alterações imunológicas ou estruturais relacionadas ao hospedeiro, embora difíceis de serem determinadas, também podem contribuir para uma boa instalação e desenvolvimento de resistência microbiana. Sabe-se que a resistência adquirida é considerada, epidemiologicamente, mais importante do que a resistência natural. Isto porque ela ocorre por mutação ou aquisição de material genético de resistência, veiculados por plasmídeos ou transposons, nas quais são claramente associados a pressão seletiva e na possível disseminação destes genes. Alterações simples em poucos pares de bases também podem afetar a estrutura cromossômica ou genes controladores, levando à resistência bacteriana (DEL FIOLE *et al.*, 2000).

3.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA EM GRAM NEGATIVOS

Entre os principais microrganismos causadores de infecções hospitalares e que apresentam mecanismos relevantes de resistência a antimicrobianos podem-se destacar os bacilos Gram negativos pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, como é o caso de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e da *Serratia marcescens* (QUEENAN; BUSH, 2007).

Trata-se de uma classe de microrganismos frequentemente associados a infecções do trato urinário, gastrointestinal e peritonite, sendo alguns também responsáveis por casos de meningites, pneumonia e sepses desenvolvidas por pacientes hospitalizados (QUEENAN; BUSH, 2007; CHANG *et al.*, 2003).

Na atualidade, os patógenos gram-negativos, majoritariamente representados pela família das Enterobactérias, são responsáveis por cerca de 30% de todas as infecções adquiridas em hospitais (WEINER-LASTINGER *et al.*, 2019). Entre 2015 e 2017, com base em dados obtidos através do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) 17,5% de *E. coli*, 8,8% de *Klebsiella* spp. e 8% de *Pseudomonas aeruginosa* foram identificadas como multirresistentes em adultos hospitalizados. Desta forma, a partir da crescente incidência dos variados mecanismos de resistência, de acordo com estudos clínicos, o índice de mortalidade relacionado às infecções ocasionadas por Enterobactérias MDR oscila entre 19% e 72% (TUMBARELLO *et al.*, 2012; QUERESHI *et al.*, 2012; ZARKOTOU *et al.*, 2011; DAIKOS *et al.*, 2014; HIRSCH

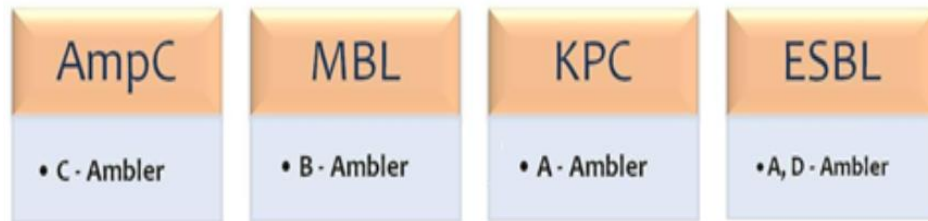
et al., 2010; BORER *et al.*, 2009).

Estes patógenos são capazes de apresentar diversos mecanismos de resistência a antimicrobianos, sendo um dos principais a produção de enzimas capazes de degradar diferentes classes de fármacos. Entre as enzimas secretadas por *K. pneumoniae*, por exemplo, destacam-se a *ampC*, capaz de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas até terceira geração e monobactâmicos e podendo ser expressa a nível cromossomal ou plasmidial; as betalactamases de espectro estendido (ESBL), responsáveis pela resistência deste microrganismo a penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos; e as carbapenemases (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 1999).

A produção de carbapenemases na família *Enterobacteriaceae* vem tomando proporções globais na última década. No último relatório publicado pelo CDC, em 2019, as CRE (do inglês, *Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae*), juntamente com *Clostridioides (Clostridium) difficile* e *Neisseria Gonorrhoeae* MDR, foram destacadas como uma ameaça urgente, para as quais medidas imediatas de controle devem ser tomadas (CDC, 2019).

Dentre os principais genes codificadores de carbapenemases, conforme a classificação de Ambler (Figura 1), categorizada na classe A a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) destaca-se como a principal representante, sendo atualmente a carbapenemase mais encontrada em *Enterobacteriaceae* (RAPP *et al.*, 2012). Carbapenemases pertencentes a classe B, as metalo-betalactamases (MBLs) também apresentam ampla disseminação mundial sobretudo na família *Enterobacteriaceae*, sendo representadas principalmente pela VIM (Verona imipenemase), IMP (Imipenemase), NDM (*New Delhi* metalo-betalactamase) e SPM (São Paulo metalo-betalactamase) (CAMARGO *et al.*, 2011; SCHEFFER *et al.*, 2010; POIREL *et al.*, 2010; BUSHNELL *et al.*, 2013). Por fim, as OXA carbapenemases, pertencentes a classe D de Ambler, vem sendo encontradas com uma frequência ascendente em enterobactérias, sendo representadas majoritariamente pelas enzimas OXA-48-like (WALTHER-RASMUSSEN *et al.*, 2006; HIGGINS *et al.*, 2010; POIREL *et al.*, 2010). O conhecimento acerca das carbapenemases é essencial, pois possibilita a análise epidemiológica das cepas analisadas e resulta num maior conhecimento aplicável ao controle dos hospitais e pacientes envolvidos.

Figura 1. Classificação de Ambler.



Fonte: AMBLER, 1980.

3.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA EM GRAM POSITIVOS

As bactérias gram-positivas compreendem 7 das 18 ameaças urgentes, graves ou relevantes à resistência a medicamentos descritas pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA em 2019. Infecções causadas por bactérias como *Staphylococcus aureus* resistente à *meticilina* (MRSA), enterococos resistentes à vancomicina (VRE) e *Clostridioides difficile* estão entre as infecções resistentes a múltiplas drogas mais comuns na América, por exemplo. Juntos estima-se que esses microrganismos causem aproximadamente 400.000 casos de infecção em pacientes hospitalizados e cerca de 17.000 mortes nos Estados Unidos, a um custo de bilhões de dólares a cada ano (CDC, 2019).

Conforme Ueno e Jorge (2006) a espécie mais comum associada a doenças humanas é o *Staphylococcus aureus*, notoriamente o mais virulento dentro do gênero. Uma vez que essas bactérias se estabelecem nos tecidos mais profundos, sua multiplicação pode causar necrose e eventual formação de abscesso. *S. aureus* está presente em uma ampla gama de infecções geralmente envolvendo cateteres permanentes e dispositivos protéticos assim como em infecções de pele, tecidos moles, ossos e articulações (TONG *et al.*, 2015). Além disso, *S. aureus* é uma das principais causas de bacteremia em países desenvolvidos, frequentemente associado a infecções metastáticas como endocardite infecciosa, artrite séptica e osteomielite, podendo muitas vezes levar a complicações como sepse e choque séptico (TONG *et al.*, 2015; LAKHUNDI; ZHANG, 2018; WEINER-LESTINGER *et al.*, 2019).

Embora a incidência de bacteremia por MRSA tenha diminuído na última década (TONG *et al.*, 2015), essa bactéria resistente ainda permanece associada aos piores resultados clínicos em comparação com o *S. aureus* sensível à *meticilina* (VAN HAL *et al.*, 2012). Atualmente, a maioria das cepas de *Staphylococcus spp.* isoladas

de pacientes hospitalizados é resistente à penicilina e a muitos outros antibióticos, no que resulta a um aumento do tempo de internação hospitalar e nos custos associados à assistência médica (ANTONANZAS; LOZANO, 2015; LAKHUNDI; ZHANG, 2018). Foi o uso clínico de oxacilina que levou ao aparecimento da bactéria *S. aureus* resistente à *meticilina*.

Além disso, a literatura relata que no decorrer dos últimos anos isolados do tipo MRSA, que até então eram exclusivos de IRAS, foram responsáveis por um gradativo aumento de infecções também entre a comunidade (CA-MRSA); casos estes que envolviam indivíduos sem qualquer interação direta ou indireta com a assistência à saúde que justificasse algum fator de risco para tal aquisição (HEROLD; IMMERGLUCK; MARANAN, *et al.*, 1998).

Lahkundi e Zhang (2018) citam o mecanismo de resistência de MRSA, mencionando a alteração das transpeptidases na parede celular, chamadas proteínas de ligação à penicilina (PBPs), que perdem a afinidade para todos os agentes β -lactâmicos, exceto a *ceftarolina*. Estas proteínas alteradas (PBP2a) são codificadas por um gene adquirido, o *mecA*, onde esse material genético é transportado em um elemento móvel designado por cromossomo staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) (HARTMAN; TOMASZ, 1984; MATSUHASHI *et al.*, 1986; HIRAMATSU *et al.*, 1992). Portanto, o surgimento de cepas de estafilococos resistentes à metilina é devido à aquisição e inserção desses elementos genéticos móveis nos cromossomos de cepas suscetíveis. Essa aquisição de resistência antimicrobiana apresentou e ainda se demonstra como um desafio ao mundo médico em termos de tratamento e controle de infecções estafilocócicas.

3.4 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT)

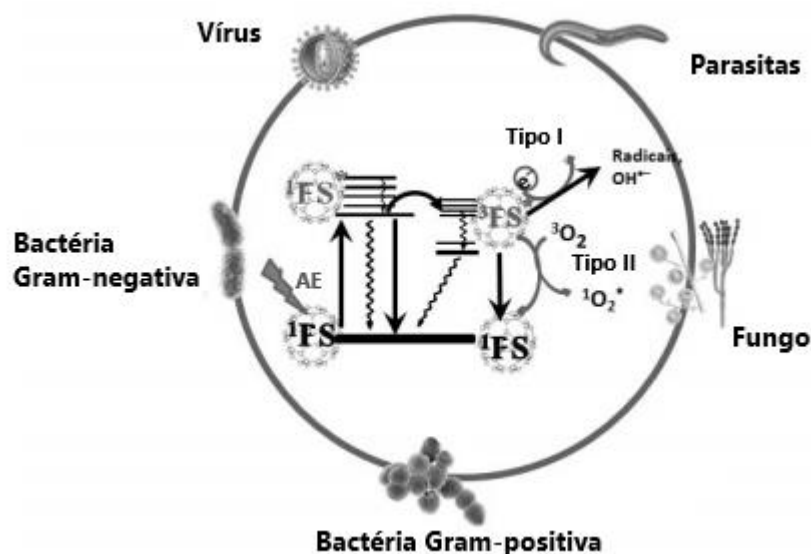
A aPDT vem sendo considerada um método promissor de abordagem para erradicar microrganismos patogênicos resistentes como bactérias Gram-negativas e positivas, leveduras e fungos, apresentando muitas vantagens sobre a terapia antibiótica tradicional (SPERANDIO; HUANG; HAMBLIN, 2013).

Tavares *et al.* (2010) mencionam esta terapia ser baseada na fotossensibilização de células com compostos exógenos referidos como fotossensibilizadores (FS). O FS ideal deve possuir baixos níveis de toxicidade no escuro e capacidade de absorver luz visível (400-800 nm) suficiente para que ocorra

alguma reação celular, como também necessita de um alto rendimento de excitação eletrônica de oxigênio em estado singleto e tripleto (SHARMA; CHIANG; HAMBLIN, 2011).

As moléculas fotossensibilizadoras são excepcionais em termos de capacidade de transferir para um estado tripleto o elétron ativado que saltou para um orbital mais energético em um estado singleto ao obter energia proveniente da luz (VALENZUELA-VALDERRAMA; GONZÁLEZ; PALAVECINO, 2019). Conforme demonstrado na Figura 2, o FS no estado tripleto recupera seu estado basal por um dos dois tipos de efeitos fotodinâmicos; doando um elétron (Tipo I), para o oxigênio solúvel, produzindo o radical superóxido ($\text{OH}^{\bullet-}$), ou transferindo a energia (Tipo II) para um oxigênio molecular tripleto, ativando-o para o estado instável de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) (FOOTE, 1968; VALENZUELA-VALDERRAMA; GONZÁLEZ; PALAVECINO, 2019).

Figura 2. Mecanismo da terapia fotodinâmica.



Fonte: Adaptado de SHARMA; CHIANG; HAMBLIN, 2011.

Através do diagrama de Jablonski é possível compreender como uma molécula (FS) em estado fundamental singleto reage quando é excitada pela absorção de luz ofertada pelos fótons, aumentando seu nível de energia. Conseqüentemente, é observada a possível cascata de eventos (tipo I e II) gerada através da interação da molécula com o ambiente.

Basicamente, é um processo que utiliza agentes sensíveis à luz e a fonte de luz propriamente dita, onde a reação geralmente acontece em um ambiente rico em oxigênio. Neste mecanismo ocorre a absorção da energia em comprimento de onda específico dos fótons pelo FS, e subseqüentemente a transferência para as moléculas de oxigênio circundantes para produzir as formas ativadas de $\text{OH}^{\bullet-}$ ou $^1\text{O}_2$ (FOOTE,

1968). Em consequência, espécies reativas de oxigênio (EROS) e radicais livres são formados. Essas moléculas oxidativas podem então danificar e causar estresse em macromoléculas bacterianas como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos resultando em morte celular (GHORBANI *et al.*, 2018).

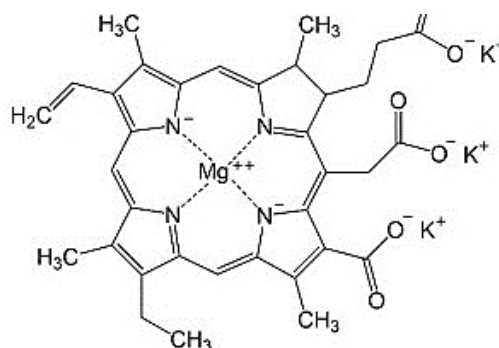
É evidente tamanha vantagem desta terapia sobre os antibióticos, conforme mencionado por LIU *et al.* (2015). Citam desde a sua forte aderência inter FS-célula bem como a ausência da toxicidade fora da região irradiada e a não seleção de cepas resistentes e mutantes assim como intervalo de tempo muito curto para o possível desenvolvimento da resistência, ao contrário do que pode ocorrer com os antimicrobianos.

O tipo de FS na aPDT é um determinante importante em relação ao seu possível resultado, sendo classificados com base em sua estrutura e origem química. Podem ser utilizados como FSs alguns pigmentos naturais (por exemplo curcumina e hipericina) e estruturas de tetra-pirrol, como ftalocianinas e porfirinas, assim como também outra opção seriam os corantes sintéticos, como azul de metileno e azul de toluidina (GHORBANI *et al.*, 2018).

3.5 CLOROFILINA

As clorofilas são moléculas formadas por complexos derivados da porfirina, tendo como átomo central o Mg (magnésio). Esse composto é uma estrutura macrocíclica assimétrica totalmente insaturada constituída por quatro anéis de pirrol (STREIT *et al.*, 2005). Inserido dentro da classe de moléculas orgânicas das porfirinas, o grupo dos “pigmentos da vida” devido a sua abundância na natureza, encontra-se o derivado da clorofila hidrófilo, a clorofilina (Figura 3).

Figura 3. Estrutura química clorofilina.



Fonte: Richter *et al.*, 2019.

Como resultado de suas propriedades de absorção, as porfirinas podem ser fotoativadas na faixa de comprimento de onda azul (banda Soret, ~ 410 nm) ou vermelha (banda Q, ~ 630-660 nm) tendo sua absorção na faixa de 450 nm (banda B ~ 400-450nm) (SILVA, 2016; HASENLEITNER; PLAETZER, 2020).

A clorofilina possui um rendimento quântico de oxigênio singleto de $\Phi \Delta = 0.3$ (FIEDOR *et al.*, 1993) e foi demonstrado sua destruição efetiva contra parasitas de peixes, caracóis e larvas de mosquito *in vitro* e *in situ* (ERZINGER *et al.*, 2011; WOHLLEBE, S. *et al.*, 2009). Na luz, ela exerce fortes propriedades fotodinâmicas sem a formação de subprodutos tóxicos, assim como sofre reações nas quais as células-alvo são destruídas, por exemplo, por meio da geração de EROS (CHATURVEDI; SINGH; SINGH, 2019).

Vantagens como alta excitação energética, alta taxa de produção de EROS e fácil modificação química tornam as porfirinas em um dos FSs mais utilizados. Como outros FSs, a presença de carga catiônica é um fator muito importante na aPDT (GHORBANI *et al.*, 2018; ALVES, 2014). Da mesma forma que possuem fortes propriedades fotodinâmicas na luz e atuando como um FS atóxico, a procura e abordagem a respeito da terapia utilizando este derivado vem sendo muito propícia para um controle bacteriano eficiente, livre dos antimicrobianos clássicos (LUKSIENE *et al.*, 2010; LUKSIENE; PASKEVICIUTE, 2011; APONIENE; LUKSIENE, 2015; RICHTER *et al.*, 2019).

Em um estudo recente de Richter *et al.* (2019) foi determinado o efeito da clorofilina solúvel em água na inativação de cepas de bactérias Gram-positivos e Gram-negativos. Apesar de ter demonstrado maiores efeitos somente nas Gram-positivas, surpreendentemente, foi descoberto que a clorofilina afeta o crescimento de bactérias também na ausência de luz, o que indica um segundo mecanismo de ação independente da luminosidade e desperta ainda mais o interesse científico nesse FS (RICHTER *et al.*, 2019).

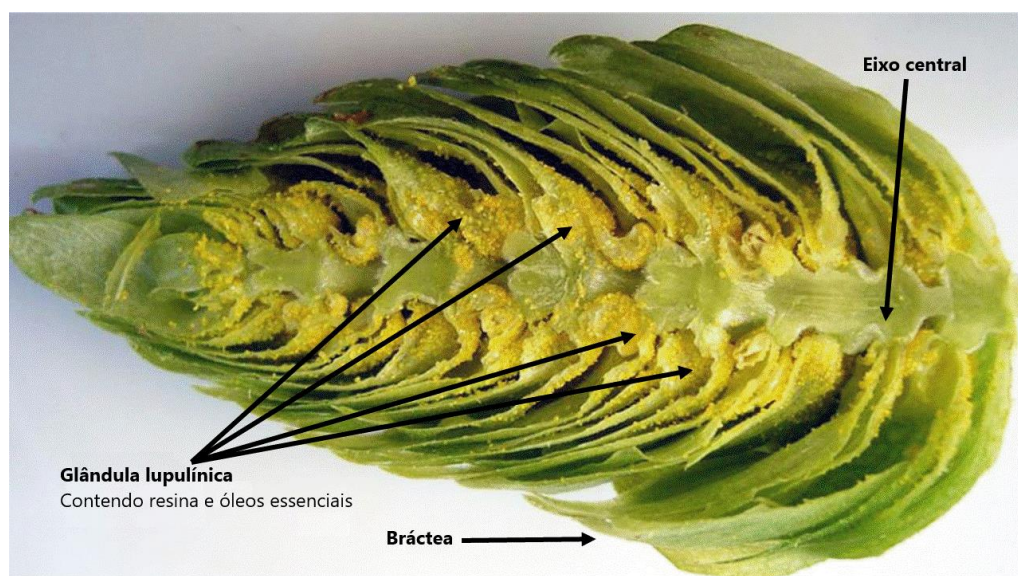
3.6 LÚPULO

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.), pertencente à família Cannabaceae, ordem Rosales, é considerado uma planta dioica, ou seja, possui dois sexos aos quais se distinguem pelo tamanho da flor e da planta (HORNSEY, 1999). Nas flores femininas

há a presença de uma estrutura morfológica denominada cone (Figura 4), cujas pétalas contêm glândulas de lupulina. Esta glândula é constituída por uma resina rica em α -ácidos nas concentrações de 2,0 - 16% (Figura 5), β -ácidos nas concentrações de 1,5 - 9,5% (Figura 6), óleos essenciais em 0,2 – 3% e polifenóis, bem como outras substâncias que variam em suas proporções de acordo com os tipos diferentes da planta (RUCKLE; SENN, 2006; SILVA; FARIA, 2008).

Conforme Silva e Faria (2008), os ácidos presentes no lúpulo além de contribuírem para o amargor, aroma e sabor da cerveja, também possuem atividade antimicrobiana, onde interferem no transporte de metabólitos na membrana bacteriana e modificam o pH intracelular, conseqüentemente levando à morte da célula por meio de insuficiência nutricional.

Figura 4. Corte transversal da flor fêmea de lúpulo.



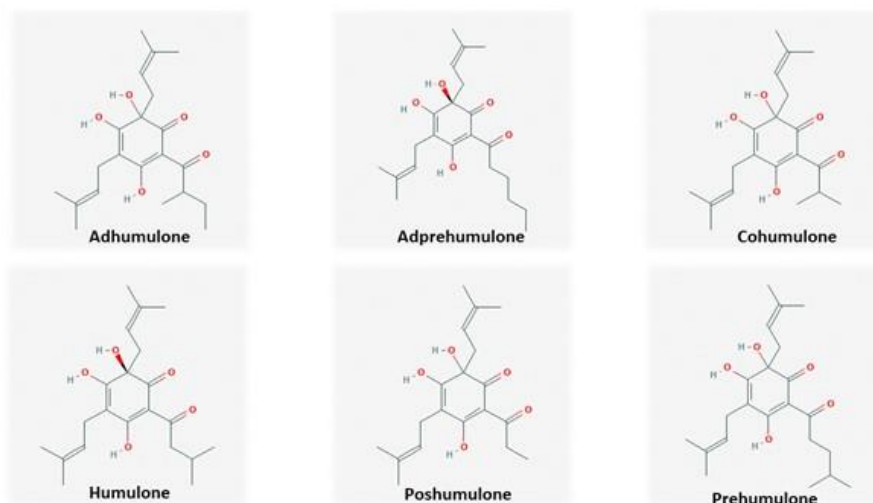
Fonte: <http://meninalupulina.blogspot.com/>.

O extrato de *Humulus lupulus* é utilizado na indústria como agente bacteriostático, técnica utilizada na fabricação de cerveja devido a inibição do crescimento de espécies bacterianas contaminantes no processo de fermentação, além de potencializar as condições fermentativas para as leveduras (RUCKLE; SENN, 2006). Sabe-se que a lupulona (α -ácido), humulona (β -ácido), isohumulona e ácido humulínico já mostraram alta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas como *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp. e *Pediococcus* sp. (SHIMWELL, 1937; CHIN *et al.*, 1949; TEUBER;

SCHMALRECK, 1973; SAKAMOTO; KONINGS, 2003).

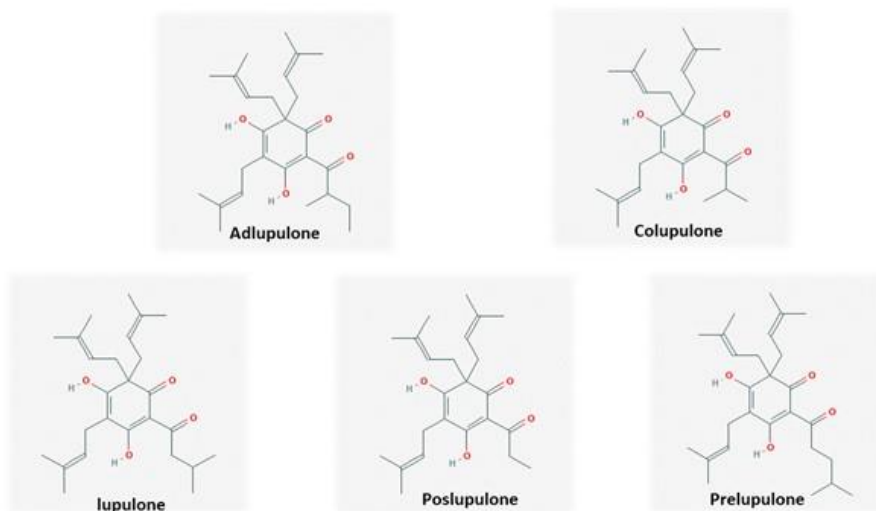
Uma análise da combinação de lupulona e xanthohumol, juntamente a antibióticos como sulfato de polimixina B, ciprofloxacino e tobramicina foi testada *in vitro* tanto em bactérias Gram-negativas quanto positivas, tendo uma coação muito promissora para ambos os tipos de microrganismos, apesar dos resultados terem sido mais significativos às Gram-positivas (NATARAJAN *et al.*, 2008).

Figura 5. Estrutura química dos principais α -ácidos do lúpulo.



Fonte: Erzinger *et al.*, 2020.

Figura 6. Estrutura química dos principais β -ácidos do lúpulo.



Fonte: Erzinger *et al.*, 2020.

Estudos vem analisando a sua atividade antibiofilme, especificamente de lupulona e xanthohumol, apresentando resultados não só capazes de penetrar o biofilme e reduzir o número de células bacterianas em seu interior, como também em suas concentrações mais elevadas reduzir o número de bactérias vivas a zero (BOGDANOVA *et al.*, 2018). Efeitos antibacterianos são notados também em pesquisas que avaliaram a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato de lúpulo ser inclusive maior contra microrganismos resistentes como MRSA, do que quando utilizados antibióticos como a clindamicina (WEBER *et al.*, 2019).

Essa planta possui uma longa história de uso como conservante natural na cerveja devido a altas concentrações de ácidos amargos únicos que inibem o crescimento de bactérias já em concentrações surpreendentemente baixas (KNEZ HRNČIČ *et al.*, 2019). Possíveis mecanismos de atividade antibacteriana destes ácidos amargos e seus derivados podem incluir o vazamento induzido da membrana bacteriana devido ao seu caráter altamente hidrofóbico, especialmente da lupulona (RÓJ *et al.*, 2015). Apesar das bem conhecidas atividades antibacterianas do lúpulo, geralmente destinada à indústria cervejeira, ainda há uma escassa quantidade de informações sobre os potenciais antimicrobianos de compostos específicos do lúpulo que podem ser destinados à saúde (DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019).

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental, de delineamento explicativo e rigor científico *in vitro*.

4.2 AMOSTRAS

Foram utilizadas para o presente trabalho no intuito da verificação da sensibilidade à terapia fotodinâmica cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) de *K. pneumoniae* (ATCC 700603), *K. pneumoniae* KPC (ATCC BAA-1705), *S. aureus* (ATCC 29213) e *S. aureus* MRSA (ATCC BAA-1026) cedidas pelo Laboratório Ghanem (DASA). Todas as cepas estavam mantidas em meio de congelamento BHI com glicerol 15% a -40°C.

4.3 SUSPENSÃO BACTERIANA

A fim do preparo do inóculo bacteriano, após o descongelamento da mesma, a cepa foi reativada em tubo contendo caldo BHI e incubada a 36°C ±1 por até 48 h. A partir do caldo BHI inoculado, foi realizada a semeadura por esgotamento em placas de Petri com ágar MacConkey (Laborclin, Pinhais, Brasil) para as cepas de *K. pneumoniae* e ágar Sangue (Laborclin, Pinhais, Brasil) para as cepas de *S. aureus*, sendo incubadas a 36°C ± 1 por 24 h.

Colônias isoladas com macro morfologia típica da espécie foram selecionadas e suspendidas diretamente em solução salina estéril (NaCl a 0,85%), para obtenção do inóculo com turbidez conforme a escala 0,5 de McFarland (concentração de 1,5 x 10⁸UFC/mL). Para isso, foi necessário medir a densidade óptica em espectrofotômetro onde no comprimento de onda de 625 nm, a densidade óptica de 0,08 a 0,1 corresponde ao padrão 0,5 (CLSI, 2003). Em seguida, foi realizada diluição em salina estéril (1:10) a fim de se obter o inóculo em mais outras duas concentrações diferentes, de 1,5 x 10⁷ e 1,5 x 10⁶ UFC/mL conforme a necessidade do teste.

4.4 FOTOSSENSIBILIZADORES

Para a sensibilização das estirpes bacterianas foram utilizados dois fotossensibilizadores: o derivado clorofilina e extrato de lúpulo.

4.4.1 Extração e padronização de clorofilina

A extração de clorofilina (CHL) a partir de folhas de couve (*Brassica oleracea*) foi realizada em ambiente escuro e à temperatura ambiente. Foram pesadas 221 g de folhas de couve, que, após adição de 5 g de carbonato de magnésio (MgCO₃, Labmaster, Pinhais, Brasil) para evitar acidificação, foram trituradas num liquidificador industrial, adicionando 1000 mL de etanol 96%. Em seguida, o líquido foi removido por filtração com vácuo. O filtrado, já bastante pálido, foi lavado com 200 mL de etanol até apresentar uma coloração amarelo claro. Conforme descrito por Krüger *et al.* (2019), filtrou-se o extrato num funil de separação, em seguida adicionou-se éter de petróleo (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e agitou-se a mistura. A clorofila migrou para a fase lipofílica superior, que foi separada; após isto foi repetido o procedimento 4 vezes (3x100 mL, 1x50 mL de éter de petróleo) até o etanol indicar a coloração amarelo. O éter de petróleo foi acrescentado e posteriormente adicionou-se 60 mL de KOH metanólico 0,1 M (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil), sendo repetido este procedimento 2 vezes, para por fim deixar o frasco em abrigo de luz sob um agitador magnético em 4°C *overnight*. Nessa fase ocorre a remoção da cauda lipofílica “fitol” da clorofila, sendo obtida clorofilina solúvel em KOH metanólico.

A concentração de clorofilina foi determinada espectrofotometricamente usando a equação descrita por Lichtenthaler e Wellburn (1983). As 221 g de couve renderam 120 mL de solução de clorofilina total (clorofilina *a* e *b*) com uma concentração de 456.477 µg/mL. O extrato foi armazenado em frasco âmbar a 4 °C até o uso. Para obter as concentrações desejadas, a quantidade precisa de solução de clorofilina foi colocada num Becker em uma chapa quente para evaporar o metanol. A clorofilina em pó restante nos frascos foi solubilizada em quantidade de água deionizada suficiente para obter as concentrações necessárias de acordo com os testes. Sendo assim, foram utilizados 9,9 mL de água deionizada para a concentração de 125 mg/L de clorofilina; já para a concentração de 62,5 mg/L foi necessário retirar 3,3 mL do frasco contendo 125 mg/L e diluir com mais 3,3 mL de água destilada. Concentrações essas que foram utilizadas devido a resultados propícios demonstrados durante a realização de ensaios preliminares, com base em dados

semelhantes já publicados (RICHTER, 2019).

4.4.2 Extração e padronização de lúpulo

Para a extração dos α -aceto ácidos presentes no lúpulo foram utilizados os métodos descritos por Knez Hrnčič *et al.* (2019) com base em uma solução etanólica. Na finalidade de preparar a solução, foram utilizados três tipos da planta de LPL com suas respectivas composições descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição das plantas utilizadas no experimento.

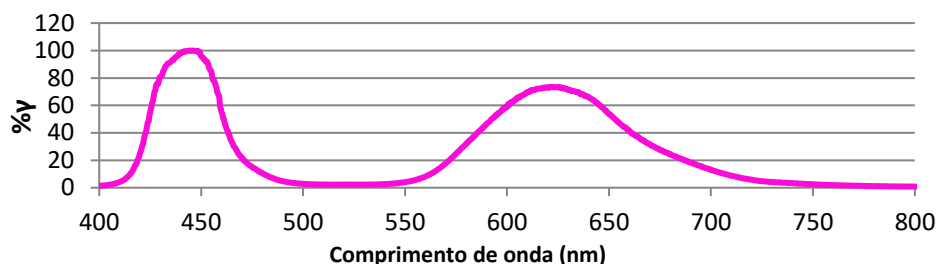
Tipo de lúpulo	Gramas	% α-aceto ácidos	% da amostra	% Total de α-aceto ácidos
Tradition	29,72	5,30	59,44	3,15
Magnum	25,17	11,74	50,34	5,91
Mittelfrüh	20,26	3,49	40,52	1,41
Total	75,15	20,53	150,30	10,47

O lúpulo foi macerado em gral de porcelana contendo 100 mL de etanol PA (Quilme). Após este processo foi adicionado 200 mL de água destilada e submetido a um sistema rotaevaporador (Fisatom 802) durante 30 minutos na temperatura de 90 °C para a extração dos alfa-aceto ácidos e retirada da fração alcoólica. Após o resfriamento, foi submetido a centrifugação por 10 min a 4°C para assim obtermos a suspensão do extrato e colocá-la sob refrigeração para posterior uso da solução. Por fim, o lúpulo foi submetido a uma filtração para que pudesse ser utilizado no experimento por filtros Millex (Merck KgaA, Alemanha) 33mm, 0,22 μ m de porosidade.

4.5 FONTE DE LUZ

Uma combinação de 6 LEDs de 50 W (Aamasun, full spectrum growth light) foi utilizada para iluminação das placas durante todo o período de incubação em uma estufa microbiológica adaptada. A intensidade da luz foi de 0,834 mW/cm², mensurada com um espectralradiômetro modelo AS7265X (Ams AG, Premstaetten, Áustria).

Figura 7. Espectro da lâmpada utilizada no experimento, padronizada para 445 nm.



4.6 AÇÃO FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT)

4.6.1 Microdiluição em caldo

O teste de microdiluição em caldo BHI foi realizado em placa específica para o experimento, contendo 96 poços de fundo plano, esterilizados e com tampa. Com as quatro cepas do estudo conforme citado na preparação do inóculo, foram utilizadas três suspensões nas concentrações de $1,5 \times 10^6$, $1,5 \times 10^7$ e $1,5 \times 10^8$ UFC/mL conforme Tabela 2. De forma adaptada à metodologia de Miyabe (2007) nos poços primários, em duplicata, foram adicionados 100µL de BHI, 100µL da suspensão bacteriana e 100µL do fotossensibilizador, que após divisão para quadruplicata apresentaram um volume final de 150µL em cada poço.

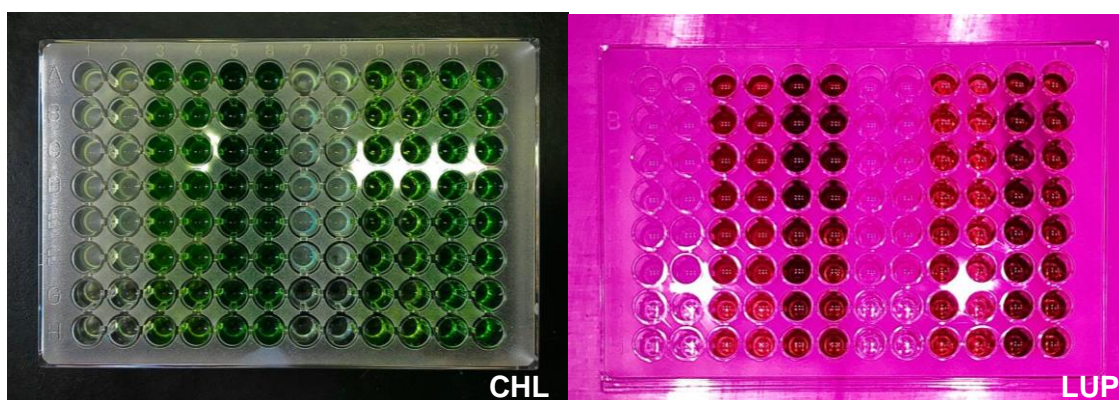
Tabela 2. Esquema do experimento de microdiluição em caldo BHI.

MICRO PLACA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8
B	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8
C	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7
D	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7
E	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6
F	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6
G	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN
H	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN
	Cepa A						Cepa B					

Cada placa contém dois microrganismos para testar em três concentrações de inoculação (10^6 , 10^7 , 10^8 /mL), controles positivos (colunas 1, 2, 7, 8) e negativos (linhas G e H). Poços primários encontram-se nas colunas em negrito. FSs (clorofilina e lúpulo) correspondem às colunas coloridas, podendo ser nas concentrações de 62,5 mg/L para clorofilina ou diluição 1:2 para lúpulo (colunas 3, 4, 9, 10) e nas concentrações de 125 mg/L para clorofilina ou diluição 1:8 para lúpulo (colunas 5, 6, 11, 12).

Sobre os FSs foram utilizadas duas concentrações de clorofilina, de 250 e 500 mg/L, que posteriormente a diluição em becker ficaram nas concentrações finais de trabalho de 62,5 e 125 mg/L. Já para o lúpulo, foram utilizadas também duas concentrações do extrato puro, sendo elas padronizadas em diluições do lúpulo com salina estéril de 1:2 e 1:8. Além dos poços com FS e inóculo bacteriano também foram feitos controles positivos de crescimento com bactéria e salina estéril e tubos de controle negativo, com FS e salina estéril. Todos os poços foram pipetados os mesmos volumes padronizados, com exceção do controle negativo sem FS que foi utilizado como branco e completado com 200µL de salina estéril para ajustar ao volume final. A seguir a placa contendo as amostras foi agitada durante 5 min em agitador orbital.

Figura 8. FSs clorofilina e lúpulo em microplacas.

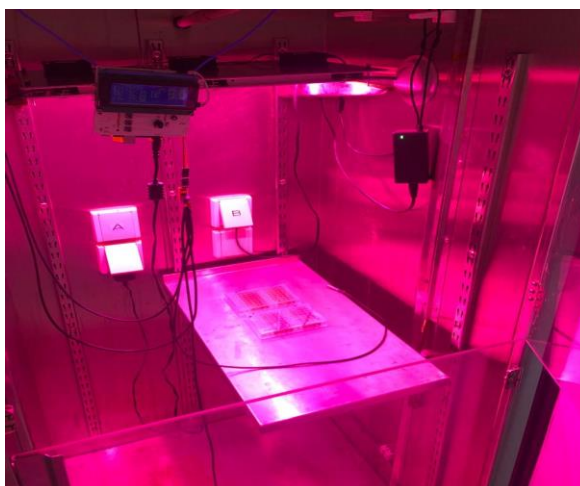


Fonte: o autor (2020).

Após o preparo das microplacas (Figura 8), foi realizada primeiramente a leitura no comprimento de onda de 490 nm em espectrofotômetro leitor de microplacas ELX800 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA) para se obter a densidade óptica (DO) das amostras no momento da inoculação (tempo 0'); para o registro dos dados de DO foi utilizado o software Biotek Gen5ELISA (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA). Em seguida as placas foram incubadas a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 24 h sob luz LED (Figura 9) com simultânea incubação em ausência total de luz utilizando papel alumínio, para que fosse possível avaliar de forma isolada a ação antimicrobiana do lúpulo e clorofilina. No segundo dia (tempo 24') foi realizada segunda leitura em 490 nm para determinar o crescimento celular através da DO após incubação de 24 h com exposição aos FSs na presença e ausência de luz LED. Todos os procedimentos que envolviam a manipulação das placas contendo as amostras

foram realizados em condições assépticas em câmara de fluxo laminar. Após a incubação das placas de microdiluição e segunda leitura da DO, as amostras foram semeadas quantitativamente com alça calibrada de 1µL em placas contendo Ágar Sangue, de modo a distribuir o material por toda a superfície do meio de cultura, estriando continuamente até o final da placa. Em seguida foram incubadas a 36 °C ± por 24 horas e realizada a contagem de UFC/mL.

Figura 9. Estufa microbiológica adaptada com LED.



Fonte: o autor (2020).

Os poços de controle negativo foram utilizados como branco para as amostras. Foi calculada a média dos valores de DO da quadruplicata do controle, em seguida esta média foi diminuída de cada valor das amostras obtendo assim os quatro valores reais correspondentes somente à quantidade de células bacterianas viáveis. Em seguida, foi calculada a média das amostras e o desvio-padrão (DP), tanto no tempo 0 quanto no tempo de 24 horas. Estes dados foram analisados para verificar a inativação do crescimento das células bacterianas pela clorofilina e lúpulo quando comparados ao crescimento dos tubos de controle positivo (sem FS).

4.7 DESCARTE DO MATERIAL

Todo o material descartável utilizado nos procedimentos experimentais foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 minutos e posteriormente descartado em lixo comum. O material não descartável foi colocado de molho em solução de hipoclorito de sódio ou formaldeído (Lysoform), por 24h, antes de ser lavado.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram comparados através de análise de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95%, utilizando o software SigmaPlot versão 12.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme citado em itens 4.1 e 4.2, foram utilizadas quatro cepas ATCC para o estudo, sendo elas *K. pneumoniae*, KPC, *S. aureus* e MRSA, em três concentrações diferentes de inóculo bacteriano ($1,5 \times 10^6$, 10^7 e 10^8 UFC/mL). Todas as amostras do experimento de microdiluição em caldo BHI foram testadas em quadruplicata e expostas aos FSs clorofilina e lúpulo, sendo elas irradiadas por LED durante a incubação e concomitantemente na ausência de luz para avaliar o efeito do fotossensibilizador de forma isolada.

Por meio das leituras de DO foi possível notar tamanha diferença na ação fotodinâmica de clorofilina entre bactérias Gram-negativas e positivas (Gráficos 1 e 2), tendo o maior efeito nas cepas de *S. aureus*, que apresentaram resultados compatíveis com outros estudos (LUKSIENE *et al.*, 2010; APONIENE; LUKSIENE, 2015; KRÜGER *et al.*, 2019; RICHTER *et al.*, 2019). Isto é justificável pela própria composição da parede celular das bactérias Gram-positivas, tendo em vista de que apresentam somente uma camada única de peptidoglicano, que apesar de mais espessa, ainda facilita a exposição desta ao FS e conseqüentemente a sua excitação quando exposta à luz. Já para as Gram-negativas, que possuem uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos glicolipídicos (LPS) e dispõe desta barreira como proteção contra várias substâncias hidrofóbicas e grandes hidrofílicas (> 600 Da), como vários antibióticos, inclusive impedindo a ação da clorofilina (NIKAIDO, 1994; RICHTER *et al.*, 2019). Dados estes que já foram confirmados por uma cepa de *E. coli* com a membrana deficiente, que após a exposição à clorofilina apresentou ser mais sensível em comparação com a cepa selvagem (KRÜGER *et al.*, 2019).

Para as amostras testadas com lúpulo, apesar de os testes terem indicado potencial de atividade antimicrobiana (Tabela 3), principalmente para bactérias Gram-positivas, foi evidenciada uma contaminação significativa por *Saccharomyces cerevisiae* quando analisado macro e microscopicamente as morfologias das colônias. Tal desafio pôde ser compreendido quando analisada metodologia da extração de lúpulo e verificada a aplicabilidade da mesma, onde ficou clara a necessidade do aperfeiçoamento da técnica de extração de lúpulo para evitar contaminação, bem como da confirmação das concentrações de α e β ácidos.

Os resultados de UFC/mL para todos os grupos e cepas utilizadas no experi-

mento estão apresentados na Tabela 3. Observa-se que obtivemos fotossensibilização somente para as bactérias Gram-positivas, não afetando as Gram-negativas *K. pneumoniae* e KPC.

Tabela 3. Médias de UFC/mL obtidas nos diferentes grupos experimentais das cepas utilizadas.

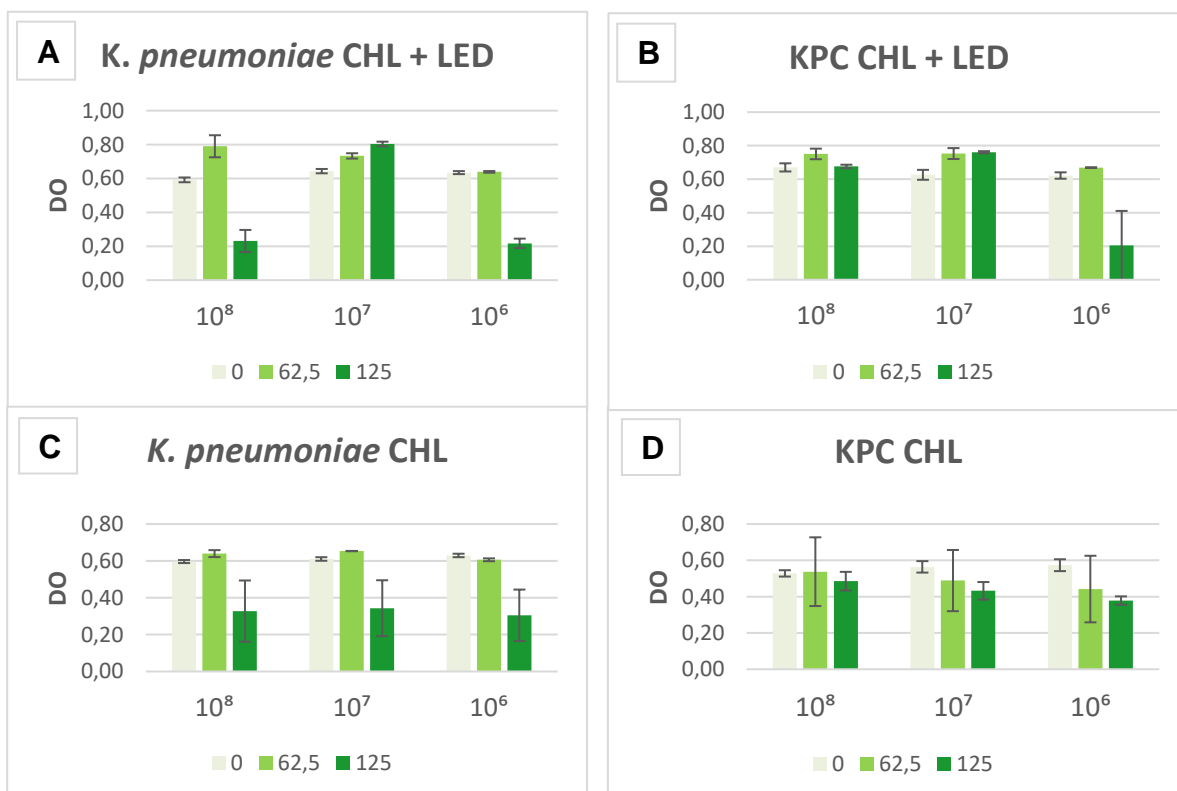
CEPA	CHL+LED 62,5 mg/L	CHL 62,5 mg/L	CHL+LED 125 mg/L	CHL 125 mg/L	LUP+LED 1:2	LUP 1:2	LUP+LED 1:8	LUP 1:8
<i>S. aureus</i> 10⁶	0	0	0	0	8.000	10.000	15.000	15.000
<i>S. aureus</i> 10⁷	0	0	0	5.000	15.000	18.000	28.000	20.000
<i>S. aureus</i> 10⁸	0	0	3.000	8.000	15.000	22.000	30.000	35.000
MRSA 10⁶	0	0	0	0	5.000	7.000	12.000	15.000
MRSA 10⁷	0	0	2.000	0	20.000	20.000	27.000	27.000
MRSA 10⁸	0	0	0	2.000	16.000	20.000	25.000	30.000
<i>K. pneumoniae</i> 10⁶	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000
<i>K. pneumoniae</i> 10⁷	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000
<i>K. pneumoniae</i> 10⁸	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000
KPC 10⁶	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000
KPC 10⁷	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000
KPC 10⁸	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000	> 100.000

Tanto para as cepas de *S. aureus* quanto para MRSA testadas, a concentração de 62,5 mg/L de CHL apresentou inibição total do crescimento após a realização da terapia fotodinâmica; o mesmo resultado foi obtido também no escuro. Para as Gram-positivas que foram testadas na CHL em 125 mg/L, foi perceptível uma grande redução expressiva no número de UFC/mL, demonstrando uma inativação microbiana maior quando exposta ao LED. Os dados sugerem então que na medida em que a concentração de clorofilina diminui, a sua ação fotodinâmica *in vitro* aumenta, tendo em vista de que se o extrato de CHL utilizado

na microdiluição em BHI não conseguir absorver a luz suficientemente para que ocorra a fotossensibilização, a terapia é falha. Este desafio é tido como fenômeno do sombreamento da clorofilina, por ela interferir na reação deste FS com a luz. Quando na presença de muito FS, a forma em que ocorre a absorção de luz é alterada, fazendo com que ela se disperse e não se concentre em quantidade suficiente para que gere estresse oxidativo.

Ainda que a aPDT não tenha apresentado algum efeito na contagem de UFC/mL das bactérias Gram-negativas após a exposição à CHL, pela leitura da DO obtivemos certos dados que apresentaram fotossensibilização (Gráfico 1). Nas amostras testadas com o FS + LED (A e B) foi possível perceber uma reação fotodinâmica maior na concentração de 125 mg/L, principalmente nas suspensões bacterianas de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL quando comparadas ao controle positivo (0); o mesmo ocorreu para a *K. pneumoniae* em $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Uma semelhante resposta foi constatada em todas as amostras incubadas no escuro (C e D), porém, com menor efeito e uma margem de DP maior do que quando testadas com luz.

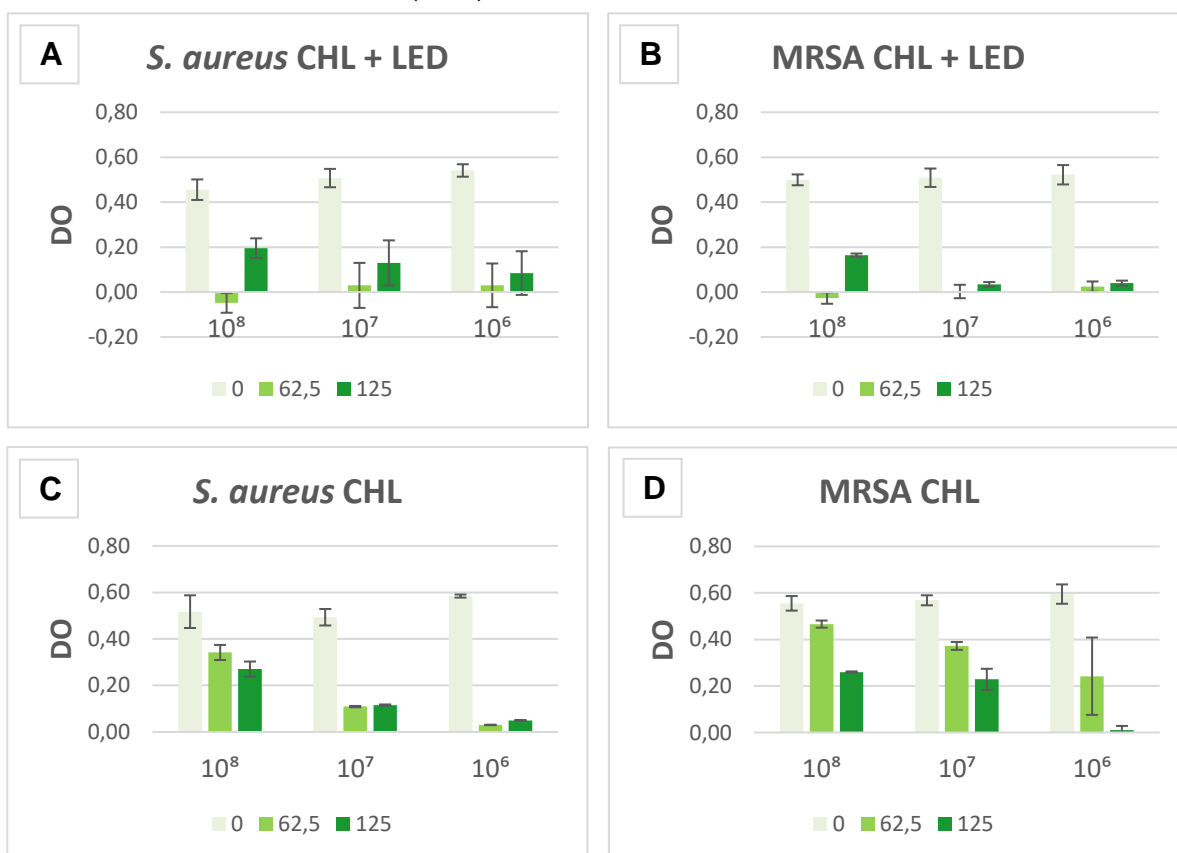
Gráfico 1. Efeito da clorofilina (CHL) em *K. pneumoniae* e KPC.



Valores médios de DO e DP das cepas Gram-negativas utilizadas, de acordo com as diferentes concentrações padronizadas $1,5 \times 10^6$, 10^7 e 10^8 UFC/mL. Colunas 0 são indicadas como controle positivo sem FS; colunas 62,5 e 125 indicam a concentração de CHL em mg/L.

Para o grupo das bactérias Gram-positivas os resultados da microdiluição em caldo BHI foram mais promissores e estão apresentados no Gráfico 2. Em concordância com as contagens de UFC/mL (Tabela 3), houve inibição total do crescimento das bactérias *S. aureus* e MRSA (A e B) em CHL de 62,5 mg/L + LED, quando comparados aos controles positivos sem CHL (0). Com relação aos grupos testados sob a ausência de luz (C e D) foi notada uma gradativa ação fotodinâmica, na medida em que há o aumento da concentração de clorofilina de 62,5 para 125 mg/L, demonstrando um potencial interessante quando utilizado CHL de forma independente ao LED. Isto significa então que quando as cepas foram expostas ao LED, a clorofilina de menor concentração (62,5 mg/L) apresentou-se mais eficiente na aPDT por decorrência da maior zona de fotossensibilização quando excitada pela luz. Já para a CHL de 125 mg/L quando irradiada, pela interferência do sombreamento não conseguiu expressar o efeito esperado.

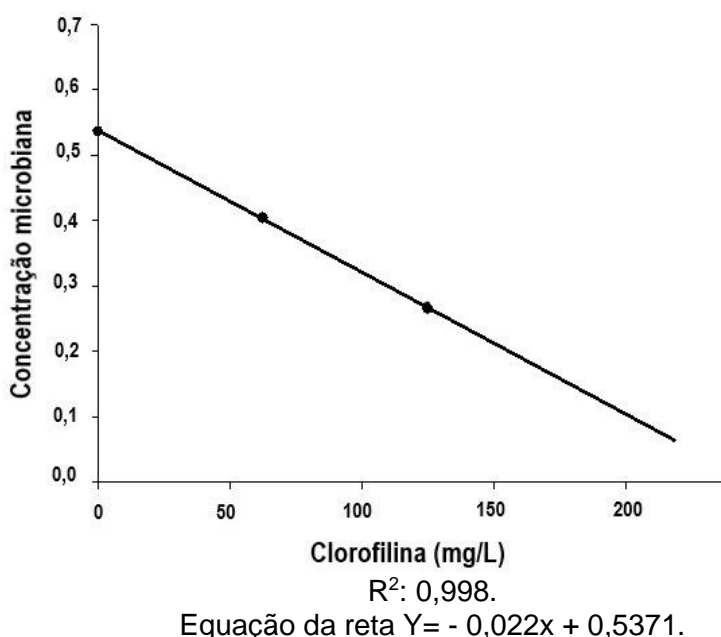
Gráfico 2. Efeito da clorofilina (CHL) em *S. aureus* e MRSA.



Valores médios de DO e DP das cepas Gram-positivas utilizadas, de acordo com as diferentes concentrações padronizadas $1,5 \times 10^6$, 10^7 e 10^8 UFC/mL. Colunas 0 são indicadas como controle positivo sem FS; colunas 62,5 e 125 indicam a concentração de CHL em mg/L.

Por motivos das Gram-positivas terem sido destacadas com uma resposta antimicrobiana melhor quando expostas à clorofilina, a cinética destas bactérias foi utilizada para uma correlação das concentrações ideais de bactéria e FS para o efeito fotodinâmico efetivo. Através do Gráfico 3, foi possível calcular a concentração letal teórica de CHL na qual apresentou resultado de 244,13 mg/L. Nas suspensões bacterianas de 10^7 e 10^6 devido a uma menor concentração de células o último ponto apresentou um aumento de DO decorrente da alta concentração de clorofilina. Apesar disto, os gráficos demonstram com bastante segurança uma inibição do crescimento, tanto na ausência de luz como na exposição ao LED, sendo que ficou evidente o efeito fotodinâmico aumentar consideravelmente a eficiência da inibição do crescimento. Assim sendo, foi comparado somente na concentração celular de 10^8 os resultados obtidos de inibição na ausência de luz e na presença.

Gráfico 3. Correlação da concentração microbiana e clorofilina ideal para aPDT.



Para esta comparação foram utilizadas análises de variâncias repetidas utilizando o software SigmaPlot versão 12.0. Todos os procedimentos de comparação múltipla de pares (método Holm-Sidak) tiveram nível de significância geral = 0,05 sendo p menor que 0,001.

Isto posto, é nítido que o composto clorofilina apresenta um comportamento diferenciado sendo dependente do tipo de microrganismo que este é utilizado como FS. Krüger *et al.* (2019) em uma abordagem para determinar os efeitos de clorofilina

em diferentes espécies bacterianas, apresentaram resultados similares ao do estudo. Em seu experimento utilizaram cepas de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* para avaliação da aPDT, indicando um achado completamente novo a respeito da reação fotodinâmica utilizando CHL. Além da fotossensibilização, *B. subtilis* também mostrou uma inativação considerável no escuro. Isso foi corroborado por resultados obtidos com uma cepa de *E. coli* (NR698) que possuía a membrana externa deficiente, indicando que o componente "escuro-ativo" da clorofilina não consegue passar pela membrana externa de Gram-negativas.

Richter *et al.* (2019) propuseram um mecanismo desestabilizador da permeabilidade da membrana externa, onde puderam avaliar que em Gram-negativas a terapia associada ao antibiótico colistina (polimixina E) tornara bactérias *E. coli* sensíveis à CHL. Um estudo recente descreveu que o sistema complemento consegue perfurar esta barreira, através da formação de poros por complexos de ataque à membrana que levam à tratabilidade de infecções causadas por Gram-negativos com antibióticos considerados ineficazes (HEESTERBEEK *et al.*, 2019). A desestabilização química pode ser alcançada com várias classes de substâncias, tais como detergentes catiônicos, quelantes como ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), grande peptídeos catiônicos e outros (VAARA, 1992; SPERANDIO; HUANG; HAMBLIN, 2013).

Para evitar o problema de permeabilidade, hoje, a fotossensibilização de Gram-negativos à base de porfirina é frequentemente combinada com outros tratamentos antimicrobianos ou desestabilizadores de membrana. Estudos utilizando porfirinas contra patógenos como o MRSA também já demonstraram serem muito eficazes na inativação destas bactérias, o mesmo apontado nos resultados do grupo B do Gráfico 2 (FERRO *et al.*, 2007). Sua atividade antimicrobiana é baseada nas propriedades químicas como a capacidade de transferir elétrons, catalisar a peroxidase, reações de oxidase, absorção de fótons, produção de EROS e a quebra dos lipídios das membranas bacterianas (STOJILJKOVIC; EVAVOLD; KUMAR, 2001). Em 2008, Maclean *et al.* relataram que a foto inativação de *S. aureus* é altamente dependente da concentração de oxigênio. Eles afirmaram que em concentrações bacterianas mais altas o oxigênio pode ser consumido mais rápido do que é reabastecido por difusão através da superfície da amostra e isso levaria a uma menor fotoativação bacteriana.

Acreditamos que uma investigação mais aprofundada da sinergia e os efeitos que a clorofilina com diferentes permeabilizadores e em diferentes cepas se faz muito necessária, para assim elucidar métodos eficazes para inativação de bactérias patogênicas. Portanto, a baixa demanda por pesquisas e desenvolvimento de novos antibióticos eficazes contra bactérias MDR e sua rápida disseminação torna essencial encontrar diferentes abordagens antimicrobianas. A terapia fotodinâmica pode ajudar frente à situação atual limitada como uma alternativa terapêutica ou profilática, facilitando a eliminação de microrganismos quando as opções se esgotam e evitando assim também a progressão da multirresistência.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, demonstramos que a clorofilina inibiu com sucesso o crescimento das bactérias Gram-positivas *S. aureus* e MRSA (Gráfico 2), comprovando ser eficaz também na inativação de patógenos resistentes a medicamentos. O efeito da clorofilina nas células foi maior sob iluminação quando expostas ao LED, confirmando a atividade fotossensibilizadora da clorofilina. Necessário compreender efeito fotodinâmico da clorofilina na ausência de luz e como exatamente este processo ocorre, tendo em vista de que ainda não há explicação para esse mecanismo. Para as bactérias Gram-negativas não obtivemos fotossensibilização significativa quando comparados resultados da contagem de UFC/mL aos resultados de DO. No entanto, sabe-se a influência que substâncias que enfraquecem a membrana externa tem, sugerindo a necessidade de futuros testes mediados por permeabilizadores de membrana. Foi demonstrado atividade antimicrobiana pelo FS lúpulo, porém, devido a contaminação do extrato faz-se necessário uma melhor padronização na extração e preparo dos α e β -ácidos. A associação do FS clorofilina ao LED é eficaz em testes *in vitro*, orientando à possibilidade dessa proposta também ser avaliada em estudos *in vivo*, tendo em vista de que é um composto inofensivo ao homem e que a terapia envolve uma irradiação atóxica às células teciduais adjacentes.

REFERÊNCIAS

ALVES, E. *et al.* An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. **Future medicinal chemistry**, v. 6, n. 2, p. 141-164, 2014.

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 289 (1036): 321–331. May 16, 1980.

AMINA, A.; KADUSKAR, D. V. Comparative Study on Photodynamic Activation of Ortho-Toluidine Blue and Methylene Blue Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles Against Resistant Microorganisms. **Recent patents on drug delivery & formulation**, 2018.

ANTONANZAS, F.; LOZANO, C.; TORRES, C. Economic features of antibiotic resistance: the case of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Pharmacoeconomics.** 33(4):285-325, 2015.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resistência Microbiana: Mecanismo e Impacto Clínico; 2007.

APONIENE, K.; LUKSIENE, Z. Effective combination of LED-based visible light, photosensitizer and photocatalyst to combat Gram (-) bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 142, p. 257-263, 2015.

BOGDANOVA, K. *et al.* Antibiofilm activity of bioactive hop compounds humulone, lupulone and xanthohumol toward susceptible and resistant staphylococci. **Research in Microbiology**, v. 169, n. 3, p. 127-134, 2018.

BORER, A.; SAIDEL-ODES, L.; RIESENBERG, K., *et al.* Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 30: 972–976, 2009.

BRASIL. Lei no. 9.431, de 06 de janeiro de 1997. Dispõe sobre a obrigatoriedade de manutenção de programas de controle de infecção hospitalar pelos hospitais do país. **Brasília: Diário Oficial da União**, 06 de janeiro de 1997.

BUSHNELL, G.; MITRANI-GOLD, F.; MUNDY, L. M. Emergence of New Delhi metallo- β -lactamase type 1 producing *Enterobacteriaceae* and non-*Enterobacteriaceae*: global case detection and bacterial surveillance. **Int J Infect Dis**, 17: 325–33, 2013.

CAMARGO, C. H.; BRUDER-NASCIMENTO, A.; MONDELLI, A. L.; MONTELLI, A. C.; SADATSUNE, T. Detection of SPM and IMP metallo- β -lactamases in clinical specimens of *Pseudomonas aeruginosa* from a Brazilian public tertiary hospital. **Braz J Infect Dis**, 15(5): 478-481, 2011.

CARNEIRO, M. *et al.* O uso de antimicrobianos em um hospital de ensino: uma breve avaliação. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 57, n. 4, p. 421-424, 2011.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic/antimicrobial resistance:

biggest threats. Available at: <http://www.cdc.gov/drugresistance/biggestthreats.html>. Accessed abril 2020. 2019.

CHAMBERS, H. F. Methicillin-resistant staphylococci. **Clin Microbiol Rev** 1: 173-186, 1988.

CHANG, M. R.; CARVALHO, N.C.; OLIVEIRA, A.L.; MONCADA, P.M.; MORAES, B.A.; ASENSI, M.D. Surveillance of pediatric infections in a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Braz J Infect Dis**. Apr;7(2):149-60, 2003.

CHATURVEDI, D.; SINGH, K.; SINGH, V. Therapeutic and pharmacological aspects of photodynamic product chlorophyllin. **EUR J Biol Res** 9: 64–76, 2019.

CHIN, Y. C.; ANDERSON, H. H.; ALDERTON, G.; LEWIS, J. C. Lupulone as tuberculostatic agent in vivo in mice. **Proc Soc exp Biol**. (N. Y.) 7, 158–162, 1949.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Sixth Edition. CLSI document M7-A6. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2003.

DAIKOS, G. L., TSAOUSI, S., TZOUVELEKIS, L. S., ANYFANTIS, I., PSICHOGIOU, M., ARGYROPOULOU, A., *et al.* Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. **Antimicrob Agents Chemother**; 58: 2322-8, 2014.

DE SANTI, M. E. S. O. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy as a new approach for the treatment of vulvovaginal candidiasis: preliminary results. **Lasers in medical science**, p. 1-7, 2018.

DE SOUZA, M. A. Emergência e disseminação de Enterococo Resistente à Vancomicina em Hospital Universitário no Centro Oeste do Brasil. 2013.

DEL FIOL, F. S.; MATTOS FILHO, T. R.; GROPPPO, F. C. Resistência bacteriana. **Rev Bras Med**. 57(10): 85-7, 2000.

DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; BOGUSZ JR.; S. Química do lúpulo. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 42, n. 8, p. 900-919, agosto, 2019.

ERZINGER, G. S. *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, G. S. *et al.* Bioactive compounds of hops resulting from the discarding of the beer industry in the control of pathogenic bacteria. In: **Natural Bioactive Compounds**. Academic Press. p. 41-55, 2020.

FERNANDEZ, J.L.; SIMPSON, W.J. Aspects of the resistance of lactic acid bacteria to hop bitter acids. **J. Appl. Bacteriol**. 75, 315– 319, 1993.

FERRO, S. *et al.* Efficient photoinactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a novel porphyrin incorporated into a poly-cationic liposome. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 5, p. 1026-1034, 2007.

FIEDOR, L.; GORMAN, A. A.; HAMBLETT, I. *et al.* A pulsed laser and pulse radiolysis study of amphiphilic chlorophyll derivatives with PDT activity toward malignant melanoma. **Photochem Photobiol.** 58, 506-511, 1993.

FOOTE, C. S. Mechanisms of photosensitized oxidation. **Science**, v. 162, n. 3857, p. 963-970, 1968.

GALLEGO, J. C. Impacto do uso de antibióticos na microbiota do solo. 2016.

GHORBANI, J. *et al.* "Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview." **Laser therapy** vol. 27,4: 293-302, 2018.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436-450, 2004.

HARTMAN, B. J.; TOMASZ, A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, v. 158, n. 2, p. 513-516, 1984.

HASENLEITNER, M.; PLAETZER, K. In the Right Light: Photodynamic Inactivation of Microorganisms using a LED-based illumination device tailored for the Antimicrobial Application. **Antibiotics**, v. 9, n. 1, p. 13, 2020.

HEESTERBEEK, D. A. C. *et al.* Complement-dependent outer membrane perturbation sensitizes Gram-negative bacteria to Gram-positive specific antibiotics. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

HEROLD, B. C.; IMMERGLUCK, L. C.; MARANAN, M. C. *et al.* Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. **JAMA**. 279:593-8, 1998.

HIGGINS, P. G.; DAMMHAYN, C.; HACKEL, M.; SEIFERT, H. N. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, 65: 233–8, 2010.

HIRAMATSU, K. *et al.* "Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)." **FEBS letters** 298.2-3: 133-136, 1992.

HIRSCH, E. B.; TAM, V. H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. **J Antimicrob Chemother**, 65: 1119–1125, 2010.

HONG, D. J.; BAE, I. K.; JANG, I. H.; JEONG, S. H.; KANG, H. K.; LEE, K. Epidemiologia e características da *Pseudomonas aeruginosa* produtora de metalo-β-

lactamase. **Infec Chemother.** 47 (2): 81-97, 2015.

HORNSEY, I. S. Elaboración de cerveza: microbiología, bioquímica y tecnología. Zaragoza: Acribia, 110 p.,1999.

HU, X. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy to control clinically relevant biofilm infections. **Frontiers in microbiology**, v. 9, 2018.

KNEZ HRNČIČ, M. *et al.* Hop compounds: Extraction techniques, chemical analyses, antioxidative, antimicrobial, and anticarcinogenic effects. **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 257, 2019.

KRÜGER, M. *et al.* "What an *Escherichia coli* Mutant Can Teach Us About the Antibacterial Effect of Chlorophyllin." **Microorganisms** vol. 7,2 59. 22 Feb. 2019.

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clin Microbiol Rev.** 2018; 31(4): e00020-18. Setembro, 2018.

LICHTENTHALER, H. K.; WELLBURN, A. R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. 1983.

LIU, Y.; QIN, R.; ZAAT, S.; BREUKINK, E. & HEGER, M. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. **Journal of clinical and translational research**, 1(3), 140–167, 2015.

LUKSIENE, Z.; BUCHOVEC, I.; PASKEVICIUTE, E. Inactivation of *Bacillus cereus* by Na-chlorophyllin-based photosensitization on the surface of packaging. **Journal of applied microbiology**, v. 109, n. 5, p. 1540-1548, 2010.

LUKSIENE, Z.; PASKEVICIUTE, E. Novel approach to the microbial decontamination of strawberries: chlorophyllin-based photosensitization. **Journal of applied microbiology**, v. 110, n. 5, p. 1274-1283, 2011.

MACLEAN, M. *et al.* The role of oxygen in the visible-light inactivation of *Staphylococcus aureus*. **Journal of photochemistry and photobiology B: Biology**, v. 92, n. 3, p. 180-184, 2008.

MAGIORAKOS, A. P. *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.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PASCUAL, A.; HERNÁNDEZ-ALLÉS, S.; ALVAREZ-DÍAZ, D.; SUÁREZ, A. I.; TRAN, J.; *et al.* Roles of beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother.** Jul;43(7):1669-7, 1999.

MATSUHASHI, M.; SONG, M. D.; ISHINO, F. *et al.* Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to beta-lactam antibiotics

in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol.** 167(3): 975-980, 1986.

MIYABE, M. **Efeito fotodinâmico antimicrobiano sobre cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de pacientes submetidos à antibioticoterapia prolongada.** 2007. Dissertação de mestrado. Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, São Paulo.

MORAES, A. L.; ARAÚJO, N. G. P.; BRAGA, T. de L. Automedicação: revisando a literatura sobre a resistência bacteriana aos antibióticos. **Revista Eletrônica Estácio Saúde**, v. 5, n. 1, p. 122-132, 2016.

NATARAJAN, P. *et al.* Positive antibacterial co-action between hop (*Humulus lupulus*) constituents and selected antibiotics. **Phytomedicine**, v. 15, n. 3, p. 194-201, 2008.

NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science**, v. 264, n. 5157, p. 382-388, 1994.

OLIVEIRA, A. C.; ALBUQUERQUE, C. P.; ROCHA, L. C. M. Infecções hospitalares: abordagem, prevenção e controle. Rio de Janeiro: Medsi. xv, 466 p, il., 1998.

PÉREZ-LAGUNA, V. *et al.* Antimicrobial effects of photodynamic therapy: an overview. Giornale italiano di dermatologia e venereologia: organo ufficiale, **Societa italiana di dermatologia e sifilografia**, 2018.

POSSEBON, M. I.; CAMARGO, E. A. Resistência bacteriana aos carbapenêmicos. **RBM Revista Brasileira de Medicina**, v. 60, n. 6, p. 378-378, 2003.

POIREL, L.; LAGRUTTA, E.; TAYLOR, P.; PHAM, J.; NORDMANN, P. Emergence of metallo- β -lactamase-NDM-1-producing multidrug resistant *Escherichia coli* in Australia. **Antimicrob Agents Chemother**, 54: 4914–6, 2010.

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, 54: 24–38, 2010.

QUEENAN, A. N.; BUSH, K. Carbapenamases: the versatile betalactamases. **Clin Microbiol Rev.** Jul; 20(3):440-58, 2007.

QUERESHI, Z. A.; PATERSON, D. L.; POTOSKI, B. A.; KILAYKO, M. C.; SANDOVSKY, G.; SORDILLO, E., *et al.* Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. **Antimicrob Agents Chemother**; 56: 2108-13, 2012.

RAPP, R. P.; URBAN, C. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: history, evolution, and microbiology concerns. **Pharmacotherapy**, 32: 399–407, 2012.

RIBEIRO, R. G. *et al.* A importância do descarte correto de medicamentos. **Mostra Científica da Farmácia**, v. 2, n. 2, 2017.

RICHTER, P. *et al.* Using colistin as a trojan horse: Inactivation of Gram-negative bacteria with chlorophyllin. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, p. 158, 2019.

RITCHIE, R. J. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. **Photosynthesis research**, v. 89, n. 1, p. 27-41, 2006.

RODRIGUES, F. d'A.; BERTOLDI, A. D. Perfil da utilização de antimicrobianos em um hospital privado. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, p. 1239-1247, 2010.

RÓJ, E. *et al.* Supercritical carbon dioxide hops extracts with antimicrobial properties. **Open Chemistry**, v. 13, n. 1, 2015.

RUCKLE, L.; SENN, T. Hop acids as natural antibacterials can efficiently replace antibiotics in ethanol production. **Betatec Hop Products**, Nuremberg, v. 7, n. 9, 2006.

SAKAMOTO, K.; KONINGS, W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. **International journal of food microbiology**, 89(2-3), 105-124, 2003.

SANTOS, de Q. N. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto contexto - enferm.** Florianópolis, v. 13, n. spe, p. 64-70, 2004.

SCHEFFER, M. C.; GALES, A. C.; BARTH, A. L.; CARMO FILHO, J. R.; DALLA-COSTA, L. M. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clonal spread in southern Brazil and in the state of Goiás. **Braz J Infect Dis**, 14(5): 508-509, 2010.

SHARMA, S. K.; CHIANG, L. Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy with fullerenes in vivo: Reality or a dream? **Nanomedicine (Lond)**. 6: 1813-25, 2011.

SHIMWELL, J. L. Sobre a relação entre as propriedades de coloração de bactérias e sua reação ao antisséptico de lúpulo. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 43, n. 2, pág. 111-118, 1937.

SILVA, P. H. A. da; FARIA, F. C. de. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 4, p. 902-906, 2008.

SILVA, L. V.; GALDINO, A. C. M.; NUNES, A. P. F.; SANTOS, K. R. N.; MOREIRA, B. N.; CACCI, L. C. *et al.* Atributos de virulência em isolados clínicos brasileiros de *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Med Microbiol**. 304 (8): 990-1000, 2014.

SILVA, S. F. G. **Interações de porfirinas aniônicas com tensioativos catiônicos DDAB, DTAB e Geminis**. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra, Coimbra.

SPERANDIO, F. F.; HUANG, Y-Y; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 8, n. 2, p. 108-120, 2013.

STREIT, N. M. *et al.* As clorofilas. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 748-755, junho, 2005.

STOJILJKOVIC, I.; EVAVOLD, B. D.; KUMAR, V. Antimicrobial properties of porphyrins. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 10, n. 2, p. 309-320, 2001.

TAPSALL, J. W. *et al.* Meeting the public health challenge of multidrug-and extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 7, n. 7, p. 821-834, 2009.

TAVARES, A.; CARVALHO, C. M.; FAUSTINO, M. A.; NEVES, M. G.; TOMÉ, J. P.; TOMÉ, A. C., *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. **Mar. Drugs** 8, 91–105, 2010.

TEUBER, M.; SCHMALRECK, A. F. Membrane leakage in *Bacillus subtilis* 168 induced by the hop constituents lupulone, humulone, isohumulone and humulinic acid. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 94, n. 2, p. 159-171, 1973.

TONG, S.Y.; DAVIS, J. S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T. L.; FOWLER, J. R. V. G. Infecções por *Staphylococcus aureus*: epidemiologia, fisiopatologia, manifestações clínicas e tratamento. **Clin Microbiol Rev.** 28: 603–61, 2015.

TUMBARELLO, M; VIALE, P.; VISCOLI, C.; TRECARICHI, E. M.; TUMIETTO, F.; MARCHESE, A., *et al.* Predictors of mortality in bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: importance of combination therapy. **Clin Infect Dis**, 55: 943-50, 2012.

UENO, M.; JORGE, A. O. C. Cocos Gram-Positivos. In: JORGE, A.O.C., **Princípios de microbiologia e imunologia**. São Paulo: Ed. Santos. Cap. 9. p. 65-84, 2006.

UNEP, United Nations Environment Programme. **Frontiers 2017 Emerging Issues of Environmental Concern**. United Nations Environment Programme, Nairobi, 2017.

VAARA, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 56, n. 3, p. 395-411, 1992.

VALENZUELA-VALDERRAMA, M.; GONZÁLEZ, I. A.; PALAVECINO, C. E. Photodynamic treatment for multidrug-resistant Gram-negative bacteria: Perspectives for the treatment of *Klebsiella pneumoniae* infections. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 28, p. 256-264, 2019.

VAN DUIN, D.; DOI, Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Virulence**, v. 8, n. 4, p. 460-469, 2017.

VAN HAL, S. J.; JENSEN, S. O.; VASKA, V. L.; ESPEDIDO, B. A.; PATERSON, D. L.; GOSBELL, I. B. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. **Clin Microbiol Rev.** 25(2): 362-386, 2012.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HOIBY, N. OXA-type carbapenemases. **J Antimicrob Chemother**, 57: 373–83, 2006.

WEBER, N. *et al.* Hop extract acts as an antioxidant with antimicrobial effects against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 24, n. 2, p. 223, 2019.

WEINER-LASTINGER, L. M.; ABNER, S.; EDWARDS, J. R.; KALLEN, A. J.; KARLSSON, M.; MAGILL, S. S.; POLLOCK, D.; SEE, I.; SOE, M. M.; WALTERS, M. S.; DUDECK, M. A. Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015–2017. **Infect Control Hosp Epidemiol** 41:1–18, 2019.

WILLYARD, C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. **Nature News**, v. 543, n. 7643, p. 15, 2017.

WOHLLEBE, S. *et al.* Photodynamic control of human pathogenic parasites in aquatic ecosystems using chlorophyllin and pheophorbid as photodynamic substances. **Parasitology research**, v. 104, n. 3, p. 593-600, 2009.

ZARKOTOU, O.; POURNARAS, S.; TSELIOTI, P.; DRAGOUMANOS, V.; PITIRIGA, V.; RANELLOU, K., *et al.* Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. **Clin Microbiol Infect**, 17: 1798-803, 2011.

AUTORIZAÇÃO

Nome do autor: Juliano Ferreira Barbosa

RG: 5.528.621

Título da Dissertação:

**AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTODINÂMICO DE CLOROFILINA E LÚPULO
NO CONTROLE ANTIMICROBIANO DE CEPAS DE *KLEBSIELLA
PNEUMONIAE* E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da dissertação de minha autoria.

Joinville, 03 de Março de 2021.



Assinatura do aluno