



## Inativação de microrganismos Inactivation of microorganisms

Thiago De Sousa Reis<sup>1</sup>, Prof. Dr. Leandro Herculano da Silva<sup>2</sup>

### RESUMO

A inibição fotodinâmica (IFD) usada para a destruição de microrganismos, dos quais, bactérias, bolores, leveduras, vírus e parasitas. Essa técnica é baseada na presença de um fotossensibilizador ativado por luz com um comprimento de onda apropriado, sendo utilizado neste trabalho a norbixina. A IFD exerce seu efeito ao expor a amostra a luz de forma controlada. O objetivo deste estudo foi empregar um sistema com uma fonte de irradiação para terapia fotodinâmica, visando especificamente a inibição da Salmonella enterica Typhimurium sob a presença de norbixina. O sistema de IFD foi desenvolvido utilizando uma matriz de (20 × 20) LEDs, cada um com potência individual de 3W e pico de emissão em 530nm. Esses LEDs foram distribuídos em uma configuração retangular para permitir o encaixe das microplacas. A norbixina foi selecionada como fotossensibilizador devido a sua capacidade de absorver luz verde na faixa de espectro de absorção de 530nm. Os resultados obtidos demonstraram que a aplicação da IFD sob a presença de norbixina apresenta um grande potencial para o controle da Salmonella entérica Typhimurium, logo a aplicação e estudo da aplicação terapia fotodinâmica em produtos com a presença deste corante promissor.

**PALAVRAS-CHAVE:** Inibição Fotodinâmica; Norbixina; Salmonella entérica Typhimurium.

### ABSTRACT

Photodynamic inhibition (IFD) is used to destroy microorganisms, including bacteria, molds, yeasts, viruses and parasites. This technique is based on the presence of a photosensitizer activated by light with an appropriate wavelength, norbixin being used in this work. IFD exerts its effect by exposing the sample to light in a controlled manner. The objective of this study was to employ a system with an irradiation source for photodynamic therapy, specifically aiming at the inhibition of Salmonella enterica Typhimurium in the presence of norbixin. The IFD system was developed using a matrix of (20 × 20) LEDs, each with an individual power of 3W and peak emission at 530nm. These LEDs were distributed in a rectangular configuration to allow the microplates to fit. Norbixin was selected as a photosensitizer due to its ability to absorb green light in the 530nm absorption spectrum range. The results obtained demonstrated that the application of IFD in the presence of norbixin has great potential for the control of Salmonella enterica Typhimurium, as well as the application and study of the application of photodynamic therapy in products with the presence of this promising dye.

**KEYWORDS:** Photodynamic inhibition; Norbixin; Salmonella entérica Typhimurium.

## INTRODUÇÃO

A saúde pública e o ônus econômico das doenças transmitidas por alimentos são frequentemente subestimados devido à subnotificação e à dificuldade de estabelecer um vínculo causal entre a contaminação dos alimentos e a doença ou morte resultante. (OMS, 2020).

<sup>1</sup> Bolsista da CNPQ. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Medianeira, Paraná, Brasil. E-mail: thiagoreis@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes:8853832784996299.

<sup>2</sup>

Departamento de física. Universidade Tecnológica federal Do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil. E-mail: herculano.utfpr@gmail.com. ID Lattes: 5350749822007916.



A Inativação Fotodinâmica (IFD) é uma metodologia que utiliza a interação entre um agente fotossensibilizador e a luz para produzir espécies oxidativas, resultando na inativação de microrganismos e células (Lin 2012). A IFD é amplamente aplicada no tratamento de doenças em humanos e animais, como câncer, infecções bacterianas e fúngicas, sendo conhecida nesses casos como Terapia Fotodinâmica (TFD). Tanto a IFD quanto a TFD dependem da interação da luz com moléculas capazes de absorver energia luminosa, denominadas fotofármacos ou fotossensibilizadores (FS). (Mariana A. 2004)

Neste estudo, abordamos os desafios associados à presença de patógenos presentes na indústria e exploramos a viabilidade da Inativação Fotodinâmica como metodologia para descontaminá-los. Nosso objetivo foi melhorar a segurança dos alimentos bem como a utilização de um corante já bem utilizado pela indústria alimentícia a norbixina.

## **MATERIAIS E METODOS**

### **MEIOS DE CULTURA E BACTERIAS**

Para a etapa do estudo envolvendo a manipulação de bactérias, foram utilizados os seguintes meios de cultura: Caldo Muller Hilton (MH) (do inglês -Mueller Hilton Broth) que é um meio de cultura indicado para o desenvolvimento de enterobactérias. Ágar para contagem de placas (PCA, do inglês - Plate Count Ágar) usado para obter a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em placa de Petri em associação com a adição de Cloreto Tetrafenil-tetrazólio (TTC) que produz coloração vermelha nas colônias que se desenvolveram no meio (PCA), facilitando sua visualização e contagem. Além dos meios de cultura e indicador acima descritos, com base na literatura sobre IFD, foi utilizado como microrganismo de estudo, a bactéria gram-negativa Salmonella entérica Typhimurium ATCC 14028.

### **PREPARO DO MEIO DE CULTURA**

Para o preparo dos meios de culturas usados no ensaio sendo eles o caldo Mueller Hinton (MHB) (do inglês Mueller Hinton Broth) e o ágar padrão de contagem (PCA) (do inglês - Plate count ágar}). Iniciou-se com a pesagem de 18 gramas do meio e realizada sua diluição em 500ml água destilada, para então realizar a pesagem do PCA sendo pesada a alíquota de 21 gramas para a então diluição em 1L de água destilada.

### **PREPARO DAS CEPAS BACTERIANAS**

O preparo das cepas se inicia com a aclimação das bactérias que se encontravam até então sobre congelamento, após a etapa de aclimação se inicia o processo de incubação das cepas por um período de vinte e quatro horas para que haja o crescimento das bactérias e elas estejam em seu pico de crescimento para serem testadas, finalizada a etapa de crescimento iniciasse a etapa de diluição da carga microbiana onde se é diluído a cepa em água destilada esterilizada até que se atinja 0,5



na escala de MCFarland adicionado inicialmente 200 micro mols de inoculo pós incubação já homogeneizado previamente em 19,8ml de MHB já esterilizado.

## PREPARO DO CORANTE

Para o preparo do corante foi então realizado a diluição do corante líquido de norbixina em água destilada esterilizada para que se obtivesse uma solução final com uma concentração de dezesseis por cento sendo então realizado a diluição seriada para as concentrações utilizadas no ensaio.

## APLICAÇÃO DA IFD

Para avaliar a eficácia da IFD, foram comparados os resultados de três tratamento em relação a uma amostra de controle. Os tratamentos consistiram em investigar o efeito da norbixina associada a luz, apenas o efeito da norbixina (na ausência de luz) e apenas o efeito gerado pela luz (na ausência de curcumina). O controle negativo consistiu em a amostra contendo apenas os inóculos bacterianos. A tabela 1 abaixo apresenta uma descrição dos componentes de cada processo, os objetivos e a simbologia usada para designar cada tipo de processo.

**Tabela 1 - Descrição dos objetivos, componentes e simbologia nos processos realizados para avaliação geral da eficácia da IFD. Os símbolos (+) e (-) designam a presença ou ausência do referido componente descrito na coluna, respectivamente.**

Objetivo	Norbixina	Luz	Bactérias	Simbologia
Avaliar IFD	+	+	+	FS+L+
Avaliar o efeito da luz	-	+	+	FS-L+
Avaliar o efeito da Norbixina	+	-	+	FS+L-
Controle negativo	-	-	+	FS-L-

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Seguindo como determinado pela tabela 1 o teste foi realizado em microplacas de 24 poços, nos quais foram manipulados em cabine de fluxo laminar de ar sob presença da área de assepsia de um bico de Bunsen.

## RESULTADOS E DISCUSSOES

Abaixo na tabela 2 são apresentados os dados referentes ao teste sob a presença de iluminação.



**Tabela 2 - Valores de UFC/ml, obtidos em triplicata e em função da concentração do corante para o tratamento por inativação fotodinâmica (FS+L+). \*\* Valores incontáveis**

Concentração	8%	4%	2%	1%	0%
1	1	224	1043	1460	<b>1408</b>
2	0	**	1356	1747	1538
3	0	14	1121	1903	**
<b>Média</b>	0,33	119	1173,33	1003	1473

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Na tabela 2 observamos que a concentração de corante de 8% gera total inibição também atingindo taxas de inibição elevadas a concentração de 4% quando comparado as demais concentrações testadas no ensaio.

**Tabela 3 - Valores de UFC/ml, obtidos em triplicata e em função da concentração do corante para o tratamento por inativação fotodinâmica (FS+L-). \*\* Valores incontáveis**

Concentração	8%	4%	2%	1%	0%
1	1	224	1043	1460	<b>1408</b>
2	0	**	1356	1747	1538
3	0	14	1121	1903	**
<b>Média</b>	0,33	119	1173,33	1003	1473

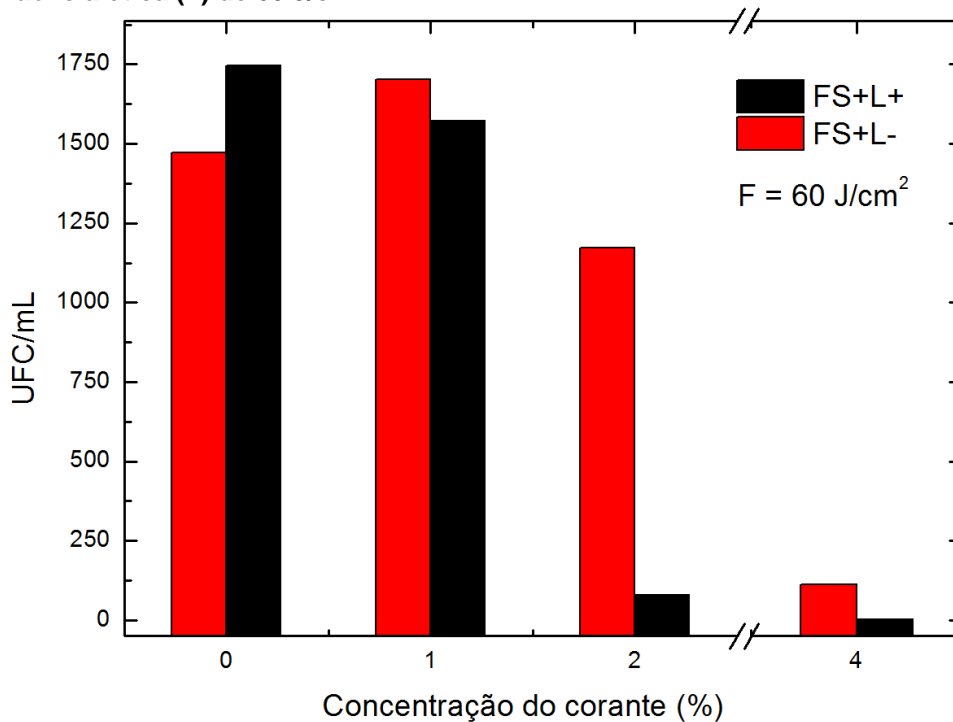
Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Como visto na tabela 3 contendo os dados do ensaio realizado na ausência de iluminação, observamos uma inibição porem com a presença de uma colônia já na concentração de 8% concentração na qual quando tratada com a terapia fotodinâmica não apresentou a presença de nenhuma colônia já nas concentrações a partir de 4% foi observado um grande aumento na formação de colônias sendo este um aumento de 92% em comparação à concentração de 4%,e de 93% para a concentração 2%, por fim 22% para a concentração de 1%.

Abaixo se encontra a figura 1 cujo qual apresenta a comparação entre os ensaios na presença e ausência de iluminação.



Figura 1 – Comparação entre a inativação fotodinâmica (FS+L+) e efeito do corante no escuro (FS+L-) no número de unidades formadoras de colônia por ml (UFC/ml), em função da concentração de corante, utilizando uma fluência ótica (F) de 60 J/cm<sup>2</sup>.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

O gráfico apresentado na figura 1 acima demonstra o número de colônias obtidas ao realizar o ensaio em cada uma das suas concentrações, logo observa-se a grande redução na carga microbiana principalmente nas concentrações de 4% e 2%, visto que na concentração de 8% obtiveram a inibição total em ambos os casos.

## Conclusão

O uso de norbixina para a inativação fotodinâmica de bactérias foi efetivo para *Salmonella enterica* Typhimurium, sendo capaz de inativar a bactéria presentes no ensaio até mesmo em baixas concentrações. A norbixina se mostrou uma alternativa promissora para a aplicação de Inativação fotodinâmica em alimentos, sendo mais eficaz em concentrações mais altas, com os testes realizados abrem a possibilidade de verificar o corante norbixina em ensaios de maiores tempos de exposição ao tratamento e para outros microrganismos patógenos e deterioradores de alimentos.

## Agradecimentos



Em agradecimento à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, por disponibilizar os laboratórios e insumos utilizados neste estudo juntamente com a disponibilidade dos professores e técnicos para o auxílio quando este era necessário. Também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, por financiar este projeto e o tornar possível, e a todos que diretamente e indiretamente me apoiaram e me auxiliaram neste projeto.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

World Health Organization. Food safety, 2020. <https://www.who.int/health-topics/food-safety>, Last accessed on 03-08-2022.

Shao-ling Lin, Jia-miao Hu, Shu-shu Tang, Xi-yang Wu, Zhen-qiang Chen, and Shu-ze Tang. Photodynamic inactivation of methylene blue and tungsten-halogen lamp light against food pathogen *listeria monocytogenes*. *Photochemistry and Photobiology*, 88(4):985–991, 2012.

Mariana A. Montenegro, Alessandro De O. Rios, Adriana Z. Mercadante, Monica A. Nazareno, and Claudio D. Borsarelli. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:367–373, 1 2004.

Hang Liu, Junbing Zhang, Yong Xiong, Shengfeng Peng, David Julian McClements, Liqi-ang Zou, Ruihong Liang, and Wei Liu. Improving norbixin dispersibility and stability by liposomal encapsulation using the ph-driven method. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102:2070–2079, 3 2022.

Bixa orellana l. (achiote, annatto) as an antimicrobial agent: A scoping review of its efficiency and technological prospecting, 4 2022.