

Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

CAMILA MONTEIRO SANTOS MARQUES

**USO DA ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO POR  
TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) NA ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES  
DOS COMPONENTES BIOMOLECULARES EM *PSEUDOMONAS  
AERUGINOSA* E *ACINETOBACTER BAUMANNII* APÓS A APLICAÇÃO DA  
TERAPIA FOTODINÂMICA COM CURCUMINA**

São José dos Campos, SP  
2022

CAMILA MONTEIRO SANTOS MARQUES

**USO DA ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO POR  
TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) NA ANÁLISE DOS COMPONENTES  
BIOMOLECULARES EM *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* E  
*ACINETOBACTER BAUMANNII* APÓS A APLICAÇÃO DA TERAPIA  
FOTODINÂMICA COM CURCUMINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D, da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Profa. Dra. Kumiko Koibuchi Sakane

Co-orientadora: Profa. Dra. Juliana Ferreira - Strixino

São José dos Campos, SP  
2022

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Marques, Camila Monteiro Santos

uso da espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de fourier (ft-ir) na análise das alterações dos componentes biomoleculares em pseudomonas aeruginosa e acinetobacter baumannii após a aplicação da terapia fotodinâmica com curcumina / Camila Monteiro Santos Marques; orientadora, Profa. Dra. Kumiko Koibuchi Sakane; co-orientadora Profa. Dra. Juliana Ferreira-Strixino. - São José dos Campos, SP, 2022.  
1 CD-ROM, 114 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. Pseudomonas aeruginosa. 3. Terapia Fotodinâmica. 4. Estatística multivariada. 5. Espectroscopia. I. Sakane, Profa. Dra. Kumiko Koibuchi, orient. II. Ferreira-Strixino, Profa. Dra. Juliana, co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Camila Monteiro Santos Marques, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 19 de Janeiro de 2023.



Autor(a) da Obra

---

**CAMILA MONTEIRO SANTOS MARQUES**

**“USO DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (FTIR) NA ANÁLISE DOS COMPONENTES BIOMOLECULARES EM *Pseudomonas aeruginosa* E *Acinetobacter baumannii* APÓS APLICAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM CURCUMINA”.**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Andreza Ribeiro Simioni	<i>Andreza Ribeiro Simioni</i>
Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Kumiko Koibuchi Sakane	<i>Kumiko Koibuchi Sakane</i>
Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Juliana Ferreira Strixino	<i>Juliana Ferreira Strixino</i>
Prof. Dr. Milton Beltrame Junior	<i>Milton Beltrame Junior</i>
Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Andrea Santos Liu - IFUSP	<i>Andrea Santos Liu</i>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 03 de novembro de 2022.

# USO DA ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) NA ANÁLISE DOS COMPONENTES BIOMOLECULARES EM *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* E *ACINETOBACTER BAUMANNII* APÓS A APLICAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM CURCUMINA

## Resumo

*Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* demonstram grande resistência intrínseca aos antibióticos, tornando-se necessárias novas abordagens terapêuticas para tratamento. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a ação antimicrobiana da Terapia Fotodinâmica (TFD) mediada pelo fotossensibilizador curcumina. Os grupos experimentais foram divididos em controle (CTL), curcumina (CUR), Irradiado (IRR) e Terapia Fotodinâmica (TFD). Os grupos CUR e TFD foram incubados com curcumina durante 20 minutos. Em seguida, os grupos TFD e IRR foram irradiados utilizando dispositivo de LED em 450 nm com densidade de potência de 50 mW.cm<sup>2</sup>, totalizando densidade energética de 30,6 J.cm<sup>2</sup>. Foram avaliadas as Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) e as alterações em biomoléculas destes patógenos quantificados pela técnica de FT-IR (Espectroscopia Infravermelha por Transformada de Fourier). Resultados mostram predominância de estrutura  $\alpha$ -hélice com diminuição drástica desta proteína e aumento das proteínas de estrutura secundária amida I desordenada e  $\beta$  folha em *P. aeruginosa* após TFD em comparação ao grupo CTL. Em contrapartida, a estrutura amida I desordenada predominou em *A. baumannii* apresentando aumento desta área após TFD, além de aumento de  $\beta$  folha e diminuição de  $\alpha$  hélice e voltas. Neste trabalho, o objetivo foi atingindo uma vez que corroboraram com os resultados avaliados através da contagem de Unidade Formadora de Colônia, demonstrando que TFD com curcumina é capaz de reduzir estatisticamente o crescimento bacteriano *in vitro*. No entanto, o mecanismo para entendimento de TFD em biomoléculas necessitam de novos estudos.

**Palavras-chave:** *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, Terapia Fotodinâmica antimicrobiana, análise estatística multivariada, espectroscopia infravermelha, estrutura secundária de proteínas.

# USE OF VIBRATIONAL FOURIER TRANSFORMATION INFRARED SPECTROSCOPY (FT-IR) IN THE ANALYSIS OF THE BIOMOLECULAR COMPONENTS IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND *ACINETOBACTER BAUMANNII* AFTER THE APPLICATION OF PHOTODYNAMIC THERAPY WITH CURCUMIN

## Abstract

*Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* demonstrate great intrinsic resistance to antibiotics, making new therapeutic approaches to treatment necessary. Thus, the objective of this work was to evaluate, *in vitro*, the antimicrobial action of Photodynamic Therapy (PDT), mediated by the photosensitizer curcumin. The experimental groups were divided into control (CTL), curcumin (CUR), irradiated (IRR), Photodynamic Therapy (PDT). The CUR and PDT groups were incubated with curcumin for 20 minutes. Then, the PDT and IRR groups were irradiated using a LED device at 450 nm with a power density of 50 mW.cm<sup>2</sup>, totalizing an energy density of 30.6 J.cm<sup>2</sup>. Colony Forming Units (CFU/mL) and changes in biomolecules of these pathogens were quantified by the FT-IR technique (Fourier Transform Infrared Spectroscopy). Results show predominance of  $\alpha$ -helix structure with drastic decrease of this protein and increase of disordered amide I secondary structure proteins and  $\beta$  sheet in *P. aeruginosa* after PDT compared to CTL group. In contrast, amide I structure random coil predominated in *A. baumannii*, showing an increase in this area after PDT, in addition to an increase in  $\beta$  sheet and decrease in  $\alpha$  helix and turns. In this work, the objective was achieved since they corroborated the results evaluated through the Colony Forming Unit count, demonstrating that PDT with curcumin is capable of statistically reducing bacterial growth *in vitro*. However, the mechanism for understanding PDT in biomolecules requires further studies.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, Antimicrobial Photodynamic Therapy, multivariate statistical analysis, infrared spectroscopy, protein secondary structure.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por efetuar em mim tanto o querer como o realizar, a fim de alcançar meus objetivos.

A minha família, em especial ao meu esposo por todo incentivo no ingresso dessa caminhada.

Aos meus filhos, por compreenderem a ausência da mamãe.

Aos meus pais, por todo suporte enquanto estive ausente, em especial ao meu pai (*in memoriam*).

A minha orientadora, professora Dra. Kumiko Koibuchi Sakane, por todo suporte, apoio, incentivo, dedicação e disponibilidade para me ensinar. Muito Obrigada.

A minha co-orientadora professora Dra. Juliana Ferreira-Strixino, por abrir as portas do laboratório FOTOBIO a fim de que este trabalho se realizasse. Agradeço por todo seu ensino e suporte.

A professora Dra. Juliana Guerra, por todo suporte técnico, juntamente com minhas colegas do laboratório FOTOBIO: Juliana Teixeira, Isabelle Ribeiro e Luciana. Obrigada pela paciência, por todo apoio e pela amizade que desenvolvemos neste período.

Aos meus colegas do Laboratório de Espectroscopia, em especial Lucas Lyra e Douglas, pelas trocas de conhecimento, pela disponibilidade em ajudar e por toda paciência. Muito Obrigada.

Aos meus colegas de aula “*on line*” citando em especial Taciana, Fernanda, Danilo, Juliana e Erick. Agradeço por toda troca de conhecimento, pelos trabalhos em grupo e pela amizade.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Engenharia Biomédica por todo aprendizado.

Aos funcionários da Universidade Vale do Paraíba, por manter a Universidade funcionando diante de toda dificuldade destes anos de pandemia.

A todos que eu não citei e que me ajudaram nesta importante conquista. Muito obrigada.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas de metodologia, resultados e discussão. ....	17
Figura 2: Absorção de luz pelo fotossensibilizador e ação fotodinâmica por meio da reação tipo I e tipo II. ....	24
Figura 3: <i>Cúrcuma Longa</i> e estrutura química da curcumina. ....	27
Figura 4: Estrutura das moléculas de BDMC, DMC e CUR. ....	28
Figura 5: Espectro eletromagnético. ....	30
Figura 6: Deformação angular e estiramento assimétrico e simétrico da molécula de água. ....	32
Figura 7: Modos de vibração no plano: tesoura (A) e balanço (B). ....	32
Figura 8: Deformação angular fora do plano: sacudida (A) e torção (B). ....	32
Figura 9: Fonte de luz, banda de emissão (A) e espectro de absorção UV-Visível de curcumina (B) ....	39
Figura 10: Espectrofotômetro <i>Spectrum Spotlight 400 FT-IR</i> de <i>Perkin-Elmer Spectrum 400</i> . ....	40
Figura 11: Espectro infravermelho das amostras de <i>P. aeruginosa</i> dos grupos controle (CTL), curcumina (CUR), irradiada (IRR) e Terapia Fotodinâmica (TFD) ....	42
Figura 12: Espectro em absorbância do grupo CTL de <i>P. aeruginosa</i> com as principais bandas. ....	43
Figura 13 Dendrograma dos espectros de CTL, IRR, CUR e TFD de <i>P. aeruginosa</i> correspondente ao experimento N=1. ....	48
Figura 14: Dendrograma dos espectros de CTL, IRR, CUR e TFD de <i>P. aeruginosa</i> correspondente ao experimento N=2. ....	49
Figura 15 Dendrograma dos espectros de CTL, IRR, CUR e TFD de <i>P. aeruginosa</i> correspondente ao experimento N=3. ....	50
Figura 16: Crescimento bacteriano de <i>P. aeruginosa</i> em placa BHI de CTL e tratamentos. ....	53
Figura 17: Histograma (UFC/mL log <sub>10</sub> ) de <i>P. aeruginosa</i> ....	53
Figura 18: Espectro FT-IR de todos os tratamentos em regiões entre 3000-2800 cm <sup>-1</sup> . (a) espectro original e (b) ajuste de curva. ....	55
Figura 19: Espectro FT-IR de todos os tratamentos em regiões entre 1800-1480 cm <sup>-1</sup> : (a) espectro original e (b) ajuste de curva ....	56
Figura 20: Espectro FTIR de todos os tratamentos em regiões entre 1480-1350 cm <sup>-1</sup> : (a) espectro original, (b) ajuste de curva ....	57
Figura 21: Espectro FT-IR de todos os tratamentos em regiões entre 1350-875 cm <sup>-1</sup> : (a) espectro original e (b) ajuste de curva. ....	58

Figura 22: Comparação de área (%) de biomoléculas do grupo CTL e grupo TFD em <i>P. aeruginosa</i> .....	69
Figura 23: Comparação de área de biomoléculas de estrutura secundária de proteínas após TFD em <i>P. aeruginosa</i> .....	70
Figura 24: Espectro de segunda derivada mostrando diferença de contornos de bandas de CTL e TFD na região de 3000 a 2800 cm <sup>-1</sup> em <i>P. aeruginosa</i> . ....	71
Figura 25: Espectro de segunda derivada mostrando diferença de contornos de bandas de CTL e TFD da região de 1800 a 1600 cm <sup>-1</sup> em <i>P. aeruginosa</i> . ....	72
Figura 26 : Espectro de segunda derivada mostrando diferença de contornos de bandas de CTL e TFD na região de 1550 a 1300 cm <sup>-1</sup> em <i>P. aeruginosa</i> . ....	72
Figura 27: Espectro de segunda derivada de CTL e TFD mostrando diferença na região de 1300 a 800 cm <sup>-1</sup> em <i>P. aeruginosa</i> .....	73
Figura 28: Espectro infravermelho da amostra controle (CTL) de <i>A. baumannii</i> . ....	74
Figura 29: Espectro infravermelho de <i>A. baumannii</i> do grupo CTL com numeração das bandas principais.....	75
Figura 30- Dendrograma de <i>A. baumannii</i> e <i>P. aeruginosa</i> demonstrando sua discriminação. ....	78
Figura 31: Dendrograma dos espectros de CTL, IRR, CUR e TFD de <i>A. baumannii</i> correspondente ao experimento N=1.....	79
Figura 32: Dendrograma dos espectros de CTL, IRR, CUR e TFD de <i>A. baumannii</i> correspondente ao experimento N=2.....	80
Figura 33: Dendrograma dos espectros de CTL, IRR, CUR e TFD de <i>A. baumannii</i> correspondente ao experimento N=3.....	82
Figura 34: Crescimento bacteriano de <i>A. baumannii</i> em placa BHI dos grupos CTL, IRR, CUR e TFD.....	84
Figura 35: Histograma (UFC/mL log <sub>10</sub> ) de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	85
Figura 36: Espectro FT-IR de todos os tratamentos em regiões entre 3000-2800 cm <sup>-1</sup> . (a) espectro original e (b) ajuste de curva. ....	87
Figura 37: Espectro FT-IR de todos os tratamentos em regiões entre 1800-1450 cm <sup>-1</sup> : (a) espectro original e (b) ajuste de curva ....	88
Figura 38: Espectro FT-IR de todos os tratamentos em regiões entre 1500-1340 cm <sup>-1</sup> : (a) espectro original, (b) ajuste de curva ....	89
Figura 39: Espectro FT-IR de todos os tratamentos em regiões entre 1400-800 cm <sup>-1</sup> : (a) espectro original, (b) ajuste de curva. ....	90

Figura 40: Comparação de área (%) de biomoléculas do grupo CTL e grupo TFD em <i>A. baumannii</i> .....	99
Figura 41: Comparação de área de biomoléculas de estrutura secundária de proteínas após TFD em <i>A. baumannii</i> .....	100
Figura 42: Espectro de segunda derivada dos grupos CTL e TFD na região 3000 a 2800 $\text{cm}^{-1}$ em <i>A. baumannii</i> .....	101
Figura 43: Espectro de segunda derivada dos grupos CTL e TFD da região de 1600 a 1300 $\text{cm}^{-1}$ em <i>A. baumannii</i> .....	101
Figura 44: Espectro de segunda derivada dos grupos CTL e TFD da região de 1800 a 1600 $\text{cm}^{-1}$ em <i>A. baumannii</i> .....	102
Figura 45: Espectro de segunda derivada dos grupos CTL e TFD da região de 1300 a 800 $\text{cm}^{-1}$ em <i>A. baumannii</i> .....	102

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de onda e descrição aproximada dos espectros infravermelhos dos constituintes biomoleculares de <i>P. aeruginosa</i> .....	44
Tabela 2- Valores de similaridade entre CTL, CUR, IRR, TFD de <i>P. aeruginosa</i> (N=1). .....	49
Tabela 3- Valores de similaridade entre CTL, CUR, IRR, TFD de <i>P. aeruginosa</i> (N=2) .....	50
Tabela 4 - Valores de similaridade entre CTL, CUR, IRR, TFD de <i>P. aeruginosa</i> (N=3) .....	51
Tabela 5 - Resultado de ANOVA para CTL e tratamentos.....	54
Tabela 6 - Cálculo de área do componente biomolecular lipídeo de grupos CTL, IRR, CUR e TFD e suas atribuições: $\nu$ , alongamento; $\delta$ deformação, s, simétrico; as, assimétrico.....	59
Tabela 7 - Cálculo de área do componente biomolecular proteína de grupos CTL, IRR, CUR e TFD e suas atribuições: $\nu$ , alongamento; $\delta$ deformação, s, simétrico; as, assimétrico.....	60
Tabela 8 - Cálculo de área do componente biomolecular conformação secundária de proteína de grupos CTL, IRR, CUR e TFD.....	61
Tabela 9 - Cálculo de área do componente biomolecular material nuclear de grupos CTL, IRR, CUR e TFD: $\nu$ , alongamento; $\delta$ deformação, s, simétrico; as, assimétrico. ....	62
Tabela 10 - Cálculo de área do componente biomolecular carboidrato de grupos CTL, IRR, CUR e TFD e sua atribuição: $\nu$ , alongamento.....	63
Tabela 11 - Número de onda e descrição aproximada dos espectros infravermelhos dos constituintes biomoleculares de <i>A. baumannii</i> . ....	76
Tabela 12- Valores de similaridade entre CTL, CUR, IRR, TFD de <i>A. baumannii</i> . (N=1). .....	80
Tabela 13 - Valores de similaridade entre CTL, CUR, IRR, TFD de <i>A. baumannii</i> (N=2) .....	81
Tabela 14 - Valores de similaridade entre CTL, CUR, IRR, TFD de <i>A. baumannii</i> (N=3). .....	83
Tabela 15 - Resultado de ANOVA para CTL e tratamentos de <i>A. baumannii</i> . ....	86

Tabela 16 - Cálculo de área do componente biomolecular lipídeo de grupos CTL, IRR, CUR e TFD e suas atribuições: $u$ , alongamento; $\delta$ deformação, $s$ , simétrico; $as$ , assimétrico.....	91
Tabela 17 - Cálculo de área do componente biomolecular proteína de grupos CTL, IRR, CUR e TFD: $u$ , alongamento; $\delta$ deformação, $s$ , simétrico; $as$ , assimétrico. ....	92
Tabela 18 - Cálculo de área de conformação secundária de proteínas dos grupos CTL, IRR, CUR e TFD.....	93
Tabela 19 - Cálculo de área de material nuclear dos grupos CTL, IRR, CUR e TFD e suas atribuições: $u$ , alongamento; $\delta$ deformação, $s$ , simétrico; $as$ , assimétrico. ....	94
Tabela 20 - Cálculo de área de carboidratos dos grupos CTL, IRR, CUR e TFD e sua atribuição: $u$ , alongamento.....	95

## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
as	Assimétrico
s	Simétrico
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CTL	Controle
CUR	Curcumina
DP	Desvio padrão
FS	Fotossensibilizador
J.cm <sup>2</sup>	Joules por centímetro quadrado
HCA	<i>“Hierarchical Cluster Analysis”</i> (análise de cluster)
IRR	Irradiado
LED	Diodo emissor de luz
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCA	<i>“Principal Componente Analysis”</i> (análise por componentes principais)
TFD	Terapia Fotodinâmica
TFDa	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
$\nu$	Estiramento
$\delta$	Deformação Angular

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVO .....	18
2.1	Objetivos gerais.....	18
2.2	Objetivos específicos.....	18
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	19
3.2	<i>Acinetobacter baumannii</i> .....	19
3.3	Resistencia Bacteriana (ESKAPE).....	20
3.4	Terapia Fotodinâmica.....	22
3.5	Princípio da Terapia Fotodinâmica.....	23
3.6	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa).....	25
3.7	Fotossensibilizadores .....	26
3.8	Curcumina.....	27
3.9	Espectroscopia vibracional no Infravermelho .....	29
3.10	Análise estatística multivariada .....	34
3.11	Análise de agrupamento hierárquico (HCA).....	34
3.12	Análise de componentes principais (PCA) .....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
4.1	Pesquisa - Ensaio <i>in vitro</i> .....	36
4.2	Linhagem microbiana .....	36
4.3	Reativação das cepas.....	36
4.4	Preparo do fotossensibilizador (FS).....	36
4.5	Experimento de Terapia Fotodinâmica e Contagem de Unidades Formadoras de colônias (UFC/mL) para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	37
4.6	Irradiação da amostra .....	38

4.7	Preparação da amostra para Espectroscopia Vibracional do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	39
4.8	Análise da amostra para espectroscopia (FT-IR).....	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	41
5.1	Análise visual dos espectros médios de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	41
5.2	Aplicação da Análise Estatística Multivariada para espectros de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	46
5.3	Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	52
5.4	Cálculo das áreas dos constituintes biomoleculares de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	54
5.5	Espectro de segunda derivada de <i>P. aeruginosa</i> .....	70
5.6	Análise visual dos espectros médios de <i>A.baumannii</i> .....	73
5.7	Aplicação de Análise Estatística Multivariada para discriminação de cepas de <i>A. baumannii</i> e cepas de <i>P. aeruginosa</i> .....	77
5.8	Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/ml) de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	83
5.9	Cálculo das áreas dos constituintes biomoleculares de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	86
5.10	Espectro de segunda derivada de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	100
6	CONCLUSÃO .....	103
	REFERÊNCIAS.....	105

## 1 INTRODUÇÃO

Um desafio para saúde pública é o surgimento de patógenos multirresistentes aos antibióticos, associados às infecções nosocomiais especialmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), salas cirúrgicas e próteses articulares, resultando em altas taxas de mortalidade com alto custo dos tratamentos. (PANG *et al.*, 2019).

A Sociedade Americana de Doenças Infecciosas, refere-se ao grupo de patógenos nosocomiais como ESKAPE, um acrônimo que compreende os nomes de seis patógenos bacterianos altamente virulentos e resistentes aos antibióticos. (THI; WIBOWO; REHM, 2020).

*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp fazem parte do grupo ESKAPE por demonstrarem intensa resistência aos agentes antimicrobianos. Produzem fatores de virulências que causam danos teciduais, bacteremia e disseminações bacterianas, com consequência sepse e morte em indivíduos imunocomprometidos, como pacientes com câncer, pós cirúrgicos, com queimaduras severas ou aqueles infectados com o Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV). (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; ZHAO *et al.*, 2020).

Os patógenos pertencentes ao grupo ESKAPE são micro-organismos Gram negativos, em forma de haste, com paredes celulares compostas por uma camada bilipídica separada pelo periplasma, que contém uma fina camada de peptidoglicano. Em sua membrana externa, estão presentes várias proteínas, muitas com funções enzimáticas e outras para passagem de nutrientes. Muitas destas proteínas estão relacionadas com a manutenção estrutural, integridade da membrana externa e forma da bactéria. (HAMBLIN; HASAN, 2004; SPERANDIO; HUANG; HAMBLIN, 2013)

*Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* demonstram grande resistência intrínseca aos antibióticos, que inclui baixa permeabilidade da membrana externa, expressão de bombas de efluxo que expulsam antibióticos da célula e produção de enzimas inativadoras de antibióticos, tornando-se necessárias novas abordagens terapêuticas para tratamento. A Terapia Fotodinâmica (TFD) tem sido estudada como tratamento contra vários micro-organismos, como bactérias (Gram positivas e Gram negativas), vírus, fungos e parasitas, com vantagem de não produzir

resistência bacteriana, mesmo após vários ciclos de tratamento. (CAVALCANTI, 2011; PANG *et al.*, 2019; BABINSK *et al.*, 2022)

O efeito da TFD acontece pelo uso de um fotossensibilizador, fonte de luz em comprimento de onda adequado ao fotossensibilizador e oxigênio molecular. Para que ocorra a Terapia Fotodinâmica é necessária a presença destes três fatores, que juntos interagem para produzir morte celular. (CAVALCANTI, 2011; SELLERA; GARGANO; POGLIANI, 2014).

O fotossensibilizador que não produza toxicidade, quando colocado no local alvo, é ativado pela irradiação de luz em comprimento de onda apropriado, absorvendo e transferindo elétrons. (AL-QADIRI *et al.*, 2006).

Moléculas de oxigênio “*in situ*” agem como receptores de elétrons, gerando radicais livres e espécie reativa de oxigênio resultando em danos irreversíveis em organelas e membrana citoplasmática com extravasamento do conteúdo celular, danos em DNA e RNA, alteração em conformação de proteínas de membranas como enzimas e sistemas de transportes de substâncias, alteração de síntese de parede celular, perda de íons de potássio com consequente morte celular por apoptose. (NICULESCU; GRUMEZESCU, 2021; POLAT; KANG, 2021; HAMBLIN; HASAN, 2004).

Um composto natural usado como fotossensibilizador em Terapia Fotodinâmica é a curcumina (CUR), conhecida por suas várias propriedades biológicas, como antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante, com absorção óptica localizada na região do azul (420 a 480 nm). (BABINSKI *et al.*, 2022; KUBRAK *et al.*, 2022).

Desta forma, a proposta deste trabalho foi de utilizá-la como fotossensibilizador em TFD e as biomoléculas como lipídeos, carboidratos, conformação secundária de proteínas e material genético presentes em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, quantificados por meio da técnica de FT-IR (Espectroscopia Infravermelha por Transformada de Fourier). Estes patógenos foram utilizados como forma não tratada (CTL), apenas irradiados (IRR), apenas com curcumina (CUR) e submetidos à Terapia Fotodinâmica (TFD).

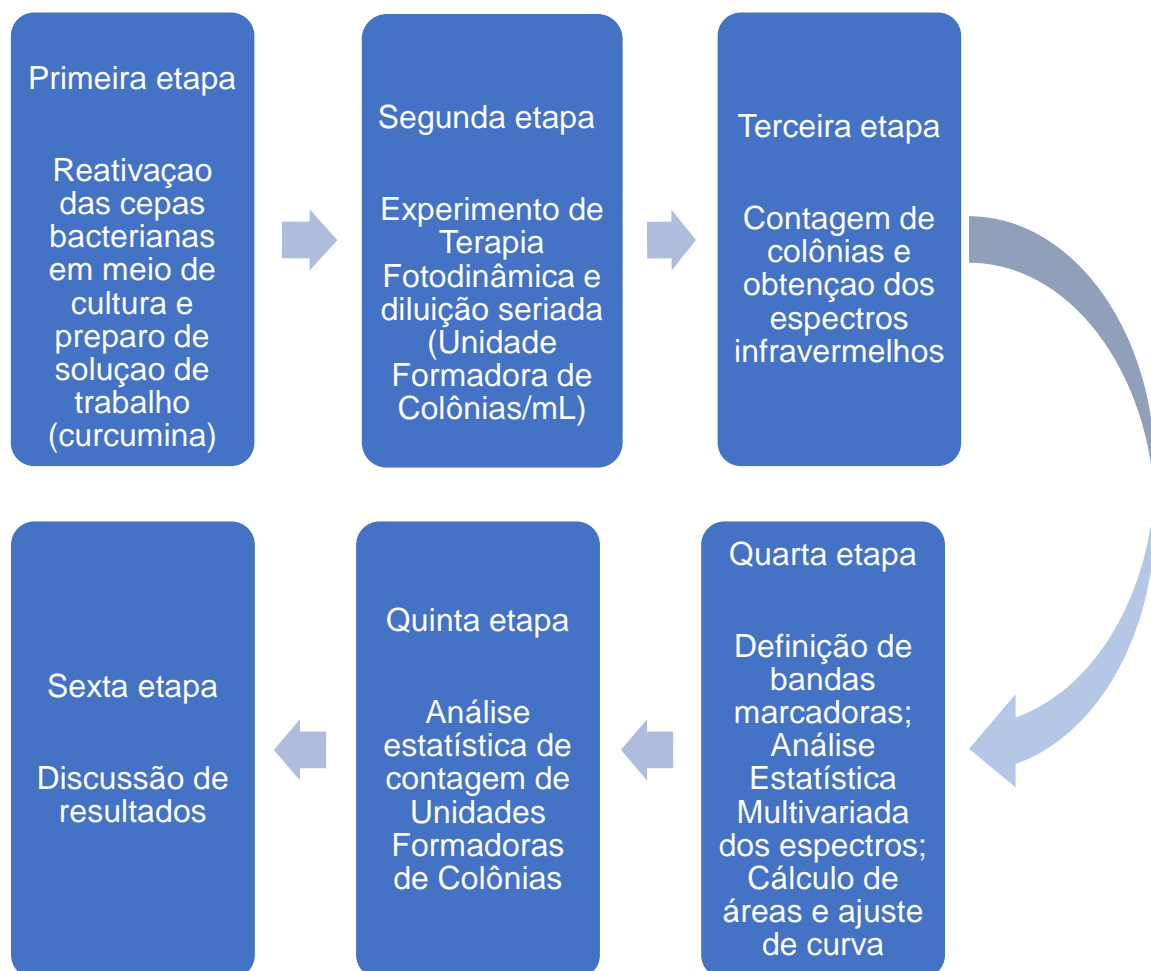
As técnicas espectroscópicas no infravermelho juntamente com Análise Estatística Multivariada e Ajuste de Curva, permitem analisar as mudanças bioquímicas decorrente da TFD, permitindo desta forma, a interpretação quantitativa de alterações no conteúdo celular bacteriano, tais como proteínas, lipídeos, material

nuclear e ácidos graxos da parede celular. Isto permite entender o mecanismo de morte celular pela TFD de modo a demonstrar sua eficácia em cepas multirresistentes sem produzir resistência bacteriana mesmo após vários ciclos de tratamento.

A Espectroscopia Vibracional no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) identifica e diferencia com rapidez os micro-organismos multirresistentes, gerando rápido diagnóstico de modo a auxiliar a conduta terapêutica antimicrobiana medicamentosa.

A figura 1 representa de forma resumida as etapas de metodologia, resultado e discussão.

Figura 1: Etapas de metodologia, resultados e discussão.



Fonte: autor

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivos gerais

Analisar o efeito da Terapia Fotodinâmica (TFD) com curcumina sobre *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) e *Acinetobacter baumannii* (*A.baumannii*) e seus constituintes biomoleculares como: lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos, por Espectroscopia Vibracional no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR).

### 2.2 Objetivos específicos

(I) Comparar as respostas obtidas pela TFD quando aplicada em cultura de bactéria em diferentes situações:

- a. Sem irradiação e sem fotossensibilizador formando o grupo controle (CTL);
- b. Com irradiação e sem a presença de fotossensibilizador formando grupo Irradiado (IRR);
- c. Sem irradiação e com a presença de fotossensibilizador formando o grupo curcumina (CUR);
- d. Com irradiação e com a presença de fotossensibilizador formando o grupo Terapia Fotodinâmica (TFD).

(II) Interpretar quantitativamente as alterações dos constituintes biomoleculares tais como: lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos, por Espectroscopia Vibracional no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR), por meio da Análise Estatística Multivariada e de Ajuste de Curva.

(III) Analisar a viabilidade bacteriana após a Terapia Fotodinâmica com curcumina em meio de cultura por Unidade Formadora de Colônias (UFC/ml).

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) é uma bactéria ambiental ubíqua, ou seja, está presente tanto em ecossistemas terrestres quanto aquáticos, e possui grande número de genes reguladores e de vias metabólicas, que tornam esse micro-organismo adaptável em várias condições de crescimento com grande versatilidade metabólica e alta adaptabilidade em mudanças ambientais. (THI; WIBOWO; REHM, 2020)

É uma bactéria oportunista que vive como patógeno comensal e ambiental com capacidade de adaptação em diferentes ambientes, tornando-se um micro-organismo de grande importância médica ao adquirir patogenicidade. (DE SOUSA *et al.*, 2021).

É uma bactéria Gram-negativa que se apresenta morfológicamente em meio de cultura como pequenas colônias, ásperas ou rugosas. Formam biofilmes que as protegem do estresse ambiental circundante e de fagocitose, conferindo-lhes capacidade de colonização a longo prazo, além de outros importantes fatores de virulência como motilidade (pili e flagelo), pigmento (piocianina), enzimas (fosfolipases, proteases e elastases) e citotoxinas. (PIRES; PARKER, 2019)

Estes fatores de virulência fazem com que as bactérias escapem da defesa do hospedeiro resultando em uma série de doenças, como infecções respiratórias, cutâneas, sanguíneas e do trato urinário. Para que ocorra infecção, a bactéria precisa aderir e colonizar a célula hospedeira, invadir o tecido e disseminar-se resultando em infecção sistêmica por danos no tecido do hospedeiro. (SULTAN; ARYA; KIM, 2021).

Em 2017, *Pseudomonas aeruginosa* foi reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como a bactéria que causa maior risco de vida devido à alta resistência intrínseca aos antibióticos, aumentando a mortalidade em indivíduos imunocomprometidos. (THI; WIBOWO; REHM, 2020).

#### 3.2 *Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) é uma bactéria que se apresenta como cocobacilo Gram-negativo não móvel. São considerados patógenos não fastidiosos,

ou seja, não necessitam de suplementos nutricionais para crescerem em meio de cultura. *Acinetobacter baumannii* é responsável por 2 a 10% das infecções hospitalares causadas por bactérias Gram negativas. (LEE *et al.*, 2017; GEDEFIE *et al.*, 2021).

Uma bactéria com predominância em ambientes úmidos (HOWARD *et al.*, 2012), mas que pode sobreviver em superfície secas por vários meses, cujos pacientes mais afetados são os imunocomprometidos com longa permanência em hospitais. Bactéria comumente isolada de secreções de orofaringe e de feridas de pele com altas taxas de resistência antimicrobiana. (NOWAK; PALUCHOWSKA, 2016).

Sua capacidade de sobreviver em superfícies abióticas por longos períodos, faz com que este micro-organismo persista no ambiente hospitalar tornando-se endêmicos neste ambiente. (PIRES; PARKER, 2019).

É um patógeno encontrado em uma variedade de habitats, incluindo solo, água e alimentos. Doenças como meningite, feridas, pneumonias (adquiridas em hospitais e em comunidade), bacteremia, queimaduras, endocardites, infecções do trato urinário, bem como infecções de pele e tecidos moles, podem ser decorrentes deste micro-organismo. Pneumonias adquiridas na comunidade possuem maior gravidade do que as adquiridas em ambiente hospitalar, onde as taxas de mortalidade podem chegar a 60%. (GEDEFIE *et al.*, 2021)

### **3.3 Resistencia Bacteriana (ESKAPE)**

Em 2017, a OMS desenvolveu uma lista de 12 famílias de bactérias causadoras de infecções resistente aos antibióticos que causam infecções hospitalares, denominadas nosocomiais. Este grupo de bactérias são também a causa de infecções em comunidade. O acrônimo ESKAPE, incluem seis destes patógenos nosocomiais que apresentam alta taxa de resistência bacteriana aos antibióticos e alta taxa de virulência. Fazem parte deste grupo: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (MANCUSO *et al.*, 2021).

De acordo com a OMS, é urgente o surgimento de novos antibióticos para combater infecções por estes micro-organismos devido ao impacto causado à saúde

humana e saúde global, pois a cada ano que passa, o número total de antibióticos eficazes contra ESKAPE estão diminuindo. (MULANI *et al.*, 2019).

Os patógenos multirresistentes, inclusive do grupo ESKAPE, estão classificados em três categorias de prioridade: crítica, alta e média. Os patógenos listados nos grupos críticos são bactérias multirresistentes a três ou mais classes de antibióticos como: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp, que apresentam ameaças para pacientes internados em hospitais que fazem uso de dispositivos hospitalares como ventilação mecânica e cateteres, além de ameaça para idosos em lares de idosos. A categoria de alta prioridade inclui bactérias como: *Enterococcus faecium* e *Staphylococcus aureus* que possuem alta resistência para vários antibióticos, como Vancomicina e Fluoroquinolonas. Na categoria de média prioridade, estão os patógenos, como: *Streptococcus pneumoniae* e *Shigella* que possuem resistência a alguns antibióticos, porém são sensíveis a outros. (BOUCHER *et al.*, 2009).

O alerta da OMS no ano de 2020 foi em relação ao aparecimento de novas cepas multirresistentes devido ao uso indiscriminado de antibióticos utilizados pelas prescrições médicas inadequadas. (DIAS *et al.*, 2022) Uma grande preocupação é que a maioria dos antimicrobianos (73%) usados para saúde humana, também são usados na indústria de alimentos para animais e seu uso extensivo pode resultar no desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos usados na saúde humana. (DENISSEN *et al.*, 2022)

No meio ambiente, a presença de patógenos ESKAPE se deve ao descarte inadequado de lixo hospitalar, esgoto e farmacêutico, atividades antrópicas como banho e natação, descarte inadequado de resíduos agrícolas, entre outros. (DENISSEN *et al.*, 2022)

Dentre vários fatores de virulência responsáveis pela patogenicidade e resistência antimicrobiana de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, estão a formação de biofilmes, que tornam essas bactérias mais resistentes aos antibióticos, menos susceptíveis a descontaminação em dispositivos abióticos, como superfícies de poliestireno, contribuindo para persistência em ambientes hospitalares. (LONGO; VUOTTO; DONELLI, 2014; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018; WU *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2019).

Os patógenos do grupo ESKAPE têm capacidade de adquirir elementos genéticos que diminuem a permeabilidade da membrana externa, além de outros fatores de resistências. Como exemplo cita-se a diminuição de expressão dos canais de porinas, aquisição ou mutação de genes de resistência que codificam proteínas que controlam difusão passiva de antibióticos através de membrana externa, expressão de bombas de efluxo que captam antimicrobianos do meio interior da célula bacteriana e os transferem para o meio extracelular, expressão de enzimas intrínsecas modificadoras de antibióticos, como  $\beta$ -lactamases, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e modificação de sítios alvos de antibióticos. (NOWAK; PALUCHOWSKA, 2016; PIRES; PARKER, 2019; PANG, 2019; MANCUSO *et al.*, 2021)

Atualmente, a Terapia Fotodinâmica (TFD) se destaca como terapia alternativa para tratamento de infecções bacterianas decorrentes do grupo ESKAPE. Outros patógenos como vírus, fungos e protozoários mostraram-se susceptíveis *in vitro*, o que torna sua aplicação *in vivo* uma opção terapêutica a ser explorada. (SELLERA; GARGANO; POGLIANI, 2014).

### 3.4 Terapia Fotodinâmica

Terapia Fotodinâmica é baseada na associação de um fotossensibilizador (FS) e radiação de luz com comprimento de onda adequado para o FS. Foi desta forma que em torno do ano de 1900, Oscar Raab na Alemanha, fez sua descoberta quando o protozoário (*Paramecia caudatum*) foi incubado com corante acridina e exposto à luz. O oxigênio no ar foi necessário para que ocorresse o efeito de morte mediada pela luz. A ação fotodinâmica foi comprovada quando se observou que a luz e o corante, isoladamente, não apresentaram qualquer efeito no protozoário. (SELLERA; GARGANO; POGLIANI, 2014; ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2017; SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002). Portanto, a associação de um FS com uma fonte de luz de comprimento de onda adequado para o FS e oxigênio molecular, resultam em formação de oxigênio reativo, resultando em morte celular. (CARVALHO *et al.*, 2014).

A Terapia Fotodinâmica possui vantagens quando comparada com terapia antimicrobiana medicamentosa. Possui baixo custo, rápido início de ação quando comparado aos antimicrobianos, tempo de tratamento reduzido, possui mínimos efeitos adversos sistêmicos pois o tratamento da infecção é de forma localizada,

elimina fatores de virulência secretados, tem ação sobre os patógenos resistentes aos antimicrobianos e possui efeito deletério independente do estado metabólico da célula-alvo. (MACHADO, 2000; RIBEIRO, 2021).

Algumas limitações podem ser observadas como o funcionamento apenas em local irradiado pela luz, independentemente do fotossensibilizador ter atingido várias regiões do corpo, o que impossibilita de ser utilizada em caso de infecções generalizadas. (FREITAS, 2018).

A Terapia Fotodinâmica mostra-se eficaz quando utilizada em combinação com a terapia antibiótica medicamentosa por agir na permeabilidade da membrana da bactéria, desestabilizando fatores de virulências como lipopolissacarídeos, bombas de efluxo, inativação de porinas e proteína A de membrana, potencializando a ação de antibióticos em todas suas concentrações. (POURHAJIBAGHER *et al.*, 2017).

### 3.5 Princípio da Terapia Fotodinâmica

Para se produzir efeito antimicrobiano é necessário a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), e para isso, utiliza-se um fotossensibilizador que possua uma banda de absorção ressonante com o comprimento de onda adequado ao FS. São utilizados como fotossensibilizadores uma vasta gama de moléculas como: azul de metileno, azul de toluidina, eosina, hematoporfirinas, curcumina, entre outros, para que as células ou micro-organismos tornem-se susceptíveis à terapia. (CAVALCANTI, 2011).

O mecanismo Terapia Fotodinâmica baseia-se na absorção de um fóton de luz em um comprimento de onda adequado ao FS, resultando em excitação de um elétron. O FS que antes se encontrava em seu estado singleto fundamental ( $S_0$ ) com nível de energia mais baixo, passa para um estado singleto excitado ( $S_n$ ) com vários subníveis vibracionais ( $S_n'$ ), muito instável com vida útil de nanossegundo, que mal permite qualquer interação com outras moléculas nas regiões circundantes. O FS em seu estado singleto excitado ( $S_n$ ), perde rapidamente sua energia decaindo através de vários subníveis até o primeiro estado singleto excitado ( $S_1$ ). Isto acontece por dois processos: radioativo e não radioativos. No processo radioativo, o FS regressa ao seu estado fundamental ( $S_0$ ) por emissão de calor ou fluorescência. No processo não radioativo, os elétrons do FS sofrem uma inversão de *Spin*, processo denominado de

cruzamento intersistemas, passando ao primeiro estado tripleto excitado ( $T_1$ ), uma forma mais elevada de energia com vida útil de microssegundo, tempo satisfatório para interação do FS com oxigênio molecular em seu estado fundamental. A partir daí duas reações ocorrem: Reação tipo I e tipo II. (HORI, 2013; SANTOS, 2020; RIBEIRO, 2021).

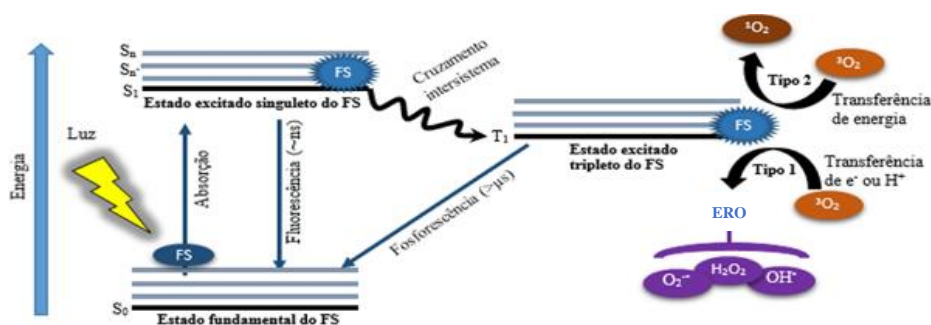
Na reação tipo I, a transferência de elétrons entre o FS no estado tripleto excitado ( $T_1$ ) e os componentes do sistema biológico, ocasionam uma reação com transferência de um elétron ( $e^-$ ) ou próton ( $H^+$ ), gerando íons radicais e radicais livres altamente instáveis, que tendem a reagir com o oxigênio presente no meio formando ERO: ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radicais hidroxila ( $OH\cdot$ ), peroxila ( $ROO\cdot$ ), alcoxila ( $RO\cdot$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e ácido hipocloroso ( $HOCl$ ). (TOMÉ, 2001; SANTOS, 2020; RIBEIRO, 2021).

Na reação tipo II, há uma transferência de energia do FS no seu estado tripleto excitado ( $T_1$ ) para oxigênio molecular, cujo estado fundamental por si só é também um estado tripleto ( $^3O_2$ ) resultando em formação de oxigênio singleto ( $^1O_2$ ), espécie altamente reativa que podem reagir com lipídeos insaturados, aminoácidos e ácidos nucleicos ocasionando danos em membranas e organelas, provocando morte celular em célula alvo via necrose ou apoptose. (SANTOS, 2020; SILVA *et al.*, 2015).

As duas reações geralmente ocorrem simultaneamente, no entanto dependem principalmente do fotossensibilizador utilizado e da concentração de oxigênio no ambiente de reação. (FREITAS, 2018).

A figura 2 demonstra o esquema de absorção de luz pelo fotossensibilizador e ação fotodinâmica por meio da reação tipo I e tipo II.

Figura 2: Absorção de luz pelo fotossensibilizador e ação fotodinâmica por meio da reação tipo I e tipo II.



Fonte: Santos (2015).

### 3.6 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa)

A TFDa é considerada uma técnica alternativa à terapia antimicrobiana medicamentosa para eliminação de inúmeros micro-organismos como: bactérias (Gram positivas e Gram-negativas), fungos, vírus e protozoários. (HUANG *et al.*, 2012).

O uso da TFDa para inativar micro-organismos patogênicos, tem mostrado-se muito promissora, pois não produz resistência bacteriana mesmo após vários ciclos de tratamento, pois o curto tempo de contato do fotossensibilizador com as bactérias e a ação fotodinâmica (como exemplificado na figura 2) sobre diversas moléculas biológicas ao mesmo tempo (proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos), dificultam a expressão de fatores protetores bacterianos minimizando a possibilidade de surgimento de resistência adquirida. (BABINSKI *et al.*, 2022).

Os fotossensibilizadores utilizados no processo de TFDa são corantes fotobactericidas que formam complexos metacromáticos com lipopolissacarídeos (LPS), proteínas de membrana (OMPs) e canais de porinas. Estas moléculas são de grande importância para virulência bacteriana em micro-organismos Gram negativos, tornando-se alvos da ação da TDFa. (FREITAS, 2018).

Quando Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) entram em contato com proteínas da célula bacteriana, ocorre aumento de degradação proteolítica, quebra de cadeia peptídica, modificação de aminoácidos e inativação de enzimas. Em biofilmes, isto reduz significativamente o metabolismo celular, além de romper sua estrutura. (POURHAJIBAGHER *et al.*, 2017).

Em material genético, ERO causa danos por oxidação ocasionando rompimento de fita, mutação de bases e ligações cruzadas de proteínas de DNA. Em lipídios presente em membrana bacteriana, ocorre peroxidação lipídica, quebra de cadeia lipídicas, alteração de fluidez e permeabilidade. (CELIEŠIŪTĒ-GERMANIENĒ *et al.*, 2021; RIBEIRO, 2021; SANTOS, 2020).

Atualmente, TFDa tem sido aplicada clinicamente para tratamento de úlceras e infecções de pele por *Pseudomonas aeruginosa* e inflamação induzida por bactérias causadoras de acne. Tem sido amplamente utilizada em odontologia, como em lesões orais (líquen plano, lesões induzidas pelo vírus herpes humano e candidíase) e terapia

endodôntica. (ABDELKARIM-ELAFIFI; PARADA-AVENDAÑO; ARNABAT-DOMINGUEZ, 2021).

A TFDa mostrou-se eficaz contra vários estágios de desenvolvimento de biofilme, bem como a remoção do mesmo em dispositivos médicos. Dispositivos médico-hospitalares contaminados representam uma séria ameaça à saúde humana através de infecções nosocomiais que podem ocasionar. A TFDa pode ser usada para repelir biofilmes de implantes, prótese articulares e aparelhos de ventilação mecânica. (CELIEŠIŪTĒ-GERMANIENĒ *et al.*, 2021; NICULESCU; GRUMEZESCU, 2021).

### 3.7 Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores (FS) são elementos chaves para ação da TFD e TFDa, e eficiência destes tratamentos dependem fortemente da concentração de FS e suas propriedades físico-químicas, bem como tempo de irradiação, fonte luz e morfologia do micro-organismo. (CELIEŠIŪTĒ-GERMANIENĒ *et al.*, 2021).

Um bom fotossensibilizador não pode ocasionar citotoxicidade significativa em ausência de luz pois deve mostrar toxicidade local somente após a ativação da luz. (CELIEŠIŪTĒ-GERMANIENĒ *et al.*, 2021). Deve ter alta seletividade pela célula-alvo com fotossensibilidade não prolongada; ter alta estabilidade biológica com mínimo efeito tóxico em células normais, porém apresentando alta produção de ERO, ser uma molécula biologicamente estável com absorção de luz dentro do espectro eletromagnético visível, ser de fácil obtenção e de simples formulação. (GURGEL, 2013, BELLI, 2020).

Para que haja sucesso na inativação microbiana em TFDa, é necessário levar em consideração a concentração do FS utilizado, ou seja, aquele que não produz dano sem que haja ativação pela luz. O FS deve estar próximo ao alvo para formação de ERO para que haja sucesso na terapia. (CORREIA, 2018).

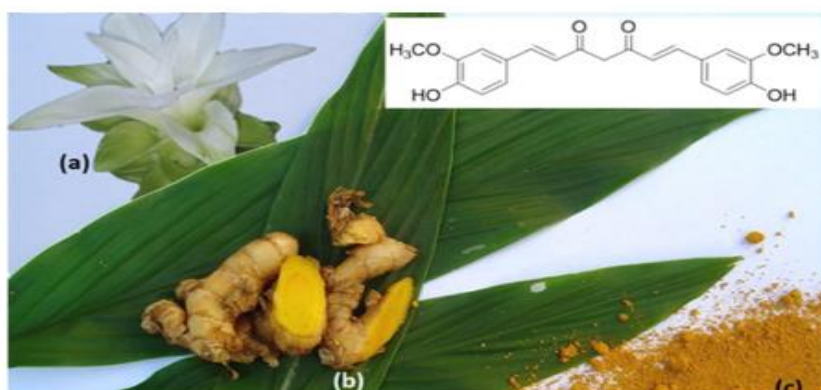
Inúmeros compostos são usados como FS em TFD, destacados por Abrahamsee, Hamblin (2016). As estruturas Tetrapirrólicas compõem o maior grupo de FS, como exemplo as Porfirinas, Clorinas, Bacterioclorinas e Ftalocianinas. Os corantes sintéticos representam uma fração considerável de FS, e entre eles, estão os derivados Fenotiazínicos como Azul de Metileno e Azul de Toluidina além dos compostos naturais como Hipericina, Hipocrelina, Riboflavina e Curcumina.

### 3.8 Curcumina

A *Curcuma longa*, comumente referida como açafrão, é conhecida pelos vários benefícios à saúde humana, como propriedades antiinflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas, antialérgicas, estimulantes, cicatrizantes, antidiabéticas, antiartríticas, antineurodegenerativas e anticancerígenas. (AL-BISHRI, 2017). É um arbusto endêmico da Índia, e a parte do vegetal com maior utilização é o rizoma, que pode ser consumido fresco ou seco. O rizoma pode ser desidratado e moído, gerando um pó de coloração dourada denominado tumérico. (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

A figura 3 mostra espécie de *Curcuma longa* com inflorescência (a); rizomas frescos (b); tumérico: rizomas secos e moídos (c)

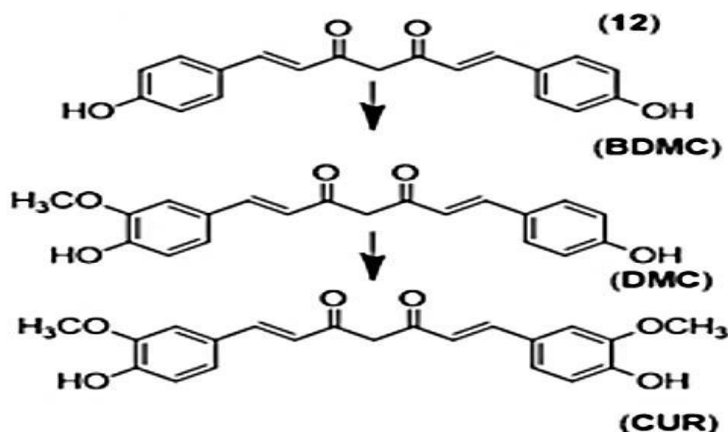
Figura 3: *Curcuma Longa* e estrutura química da curcumina.



Fonte: Sueth-Santiago *et al.* (2015).

Os curcuminóides são compostos por uma mistura de curcumina (CUR, ~77%), desmetoxicurcumina (DMC, ~17%); e bisdesmetoxicurcumina (BDMC, ~3%). Porém em razão de suas propriedades físico-químicas e biológicas, a curcumina tem sido utilizada em diversos grupos de pesquisa. É uma molécula de fácil acesso, possuindo expressiva atividade em uma série de modelos biológicos *in vitro*. As estruturas deste composto podem ser visualizadas na figura 4. (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

Figura 4: Estrutura das moléculas de BDMC, DMC e CUR.



Fonte: Adaptado de Sueth-Santiago *et al.*, (2015); Ribeiro, (2021).

Embora seja um composto medicinal e uma especiaria conhecida por séculos, a curcumina é relativamente recente no campo da Terapia Fotodinâmica. É utilizada em sua maioria como fotossensibilizador antimicrobiano ativada pela luz azul. (ABRAHAMSE; HAMBLIN, *et al.* 2016).

De acordo com Kubrak *et al.* (2022), vários estudos foram realizados com o uso de curcumina na TFD demonstrando que este composto se configura como um bom FS, apresentando absorção máxima de luz no espectro visível do azul no comprimento de onda de 420-480 nm. Foi destacado que os curcuminóides utilizados na TFD inibiram significativamente a viabilidade celular em linhagens de células de câncer de mama e a desmetoxicurcumina apresentou maior efeito antiproliferativo, antibacteriano, antiviral, antitumoral e anti-inflamatória.

Santezi *et al.* (2018) evidenciaram a aplicação promissora de CUR contra diversos patógenos utilizando a TFDa. A CUR apresentou diminuição da viabilidade de testes *in vitro* utilizando culturas planctônicas de micro-organismos e de biofilmes, evidenciando que a CUR tem grande potencial para ser utilizada como fármaco fotossensibilizante. Porém, um ponto a ser relatado é a baixa estabilidade da CUR após a manipulação, ocasionando alto índice de fotodegradação, sendo necessário seu uso quase que imediatamente após o manuseio.

Leite *et al.* (2014) investigaram os efeitos da TFD com curcumina e luz azul sobre o número de Unidades Formadora de Colônias (UFC) em saliva. Voluntários incluídos no grupo TFD bochecharam solução de curcumina e a luz azul foi introduzida na cavidade oral. O resultado mostra que o grupo TFD apresentou redução significativa

de UFC, demonstrando que a TFD usando curcumina pode ser um tratamento importante para redução de micro-organismos salivares.

Uma pesquisa conduzida por Freitas *et al.* (2019) avaliou *in vitro*, a ação da TFD mediada pela curcumina em inativação de *Staphylococcus aureus* multirresistente. Seu estudo demonstrou que a TFD foi capaz de inibir o crescimento desta bactéria *in vitro* modificando a adesão bacteriana, impedindo formação de biofilmes, concluindo que TFD com curcumina pode ser uma alternativa para o controle bacteriano desta cepa.

### 3.9 Espectroscopia vibracional no Infravermelho

As técnicas de espectroscopia no infravermelho avançaram de acordo com o desenvolvimento da tecnologia e da ciência, sendo aplicadas nas mais diversas áreas, como na agricultura, alimentação, meio ambiente e biomedicina. Esta técnica é utilizada para caracterizar materiais em várias formas como líquidos, soluções, pastas, pós, filmes, fibras e gases. (WORKMAN BURNS; CIURCZAK, 2001; NANDIYANTO; OKTIANI; RAGADHITA, 2019; FINLAYSON; RINALDI; BAKER, 2019).

A espectroscopia é a ciência que estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria. Uma onda eletromagnética é composta pelos campos elétricos magnéticos e que oscilam com a frequência da onda mantendo-se ortogonais entre si. O processo que produz a absorção é basicamente o da interação de seu campo eletromagnético com um dipolo elétrico, sendo assim, a molécula ao absorver a radiação irá converter a energia recebida em energia vibratória proporcionando um espectro vibracional. Isto pode ocasionar mudanças na geometria molecular, gerando mudanças na distribuição dos elétrons. (BASSI, 2001).

Os átomos vibram de modos diferentes, pois conjunto de átomos de uma molécula tem seus modos naturais de vibração, portanto a luz incidente sobre a molécula na região do infravermelho determina a frequência absorvida por ela. (LEITE; PRADO., 2012).

A interação entre fótons da radiação infravermelho e a molécula resultam em excitação dos modos vibracionais. O aparecimento, o desaparecimento e a alteração no contorno de bandas espectrais são resultados da interação da radiação com a molécula. Como consequência, sua geometria pode variar pois depende desta interação. A intensidade das bandas se relaciona com a variação de momento dipolar

da ligação durante a vibração trazendo informações importantes em relação a natureza da ligação. A intensidade de bandas varia com a concentração e natureza dos grupos funcionais da molécula. (SAKANE *et al.*, 2011; BUNACIU; ABOUL-ENEIN; FLESCHEIN, 2015).

A velocidade de propagação da radiação eletromagnética no vácuo é constante para todas as regiões do espectro. Isto é conhecido como velocidade da luz, cujo valor é:  $c = 2,99793 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$  e a velocidade da onda é o produto do comprimento de onda ( $\lambda$ ) pela frequência ( $f$ ) mostrada na equação (1). A energia ( $E$ ) é diretamente proporcional a frequência ( $f$ ) e ( $h$ ) é constante de Planck ( $6,626068 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \text{ kg/s}$ ) segundo a equação (2). O número de onda ( $\bar{\nu}$ ) é o inverso de comprimento de onda mostrada na equação (3). (STUART, 1997).

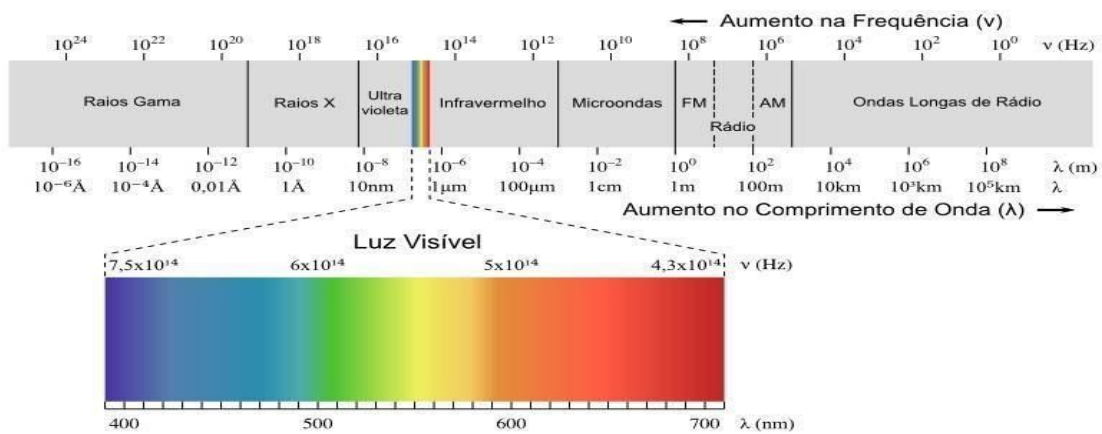
$$c = f \lambda \quad (1)$$

$$E = hf \quad (2)$$

$$\bar{\nu} = \lambda^{-1} = f c^{-1} \quad (3)$$

O espectro eletromagnético é formado como o conjunto de radiações eletromagnéticas, dividido de acordo com suas frequências e comprimentos de onda e estende-se numa faixa com frequências que vai de  $10^{24}$  até  $10^0$  Hz, contendo várias regiões descritas na figura 5.

Figura 5: Espectro eletromagnético.



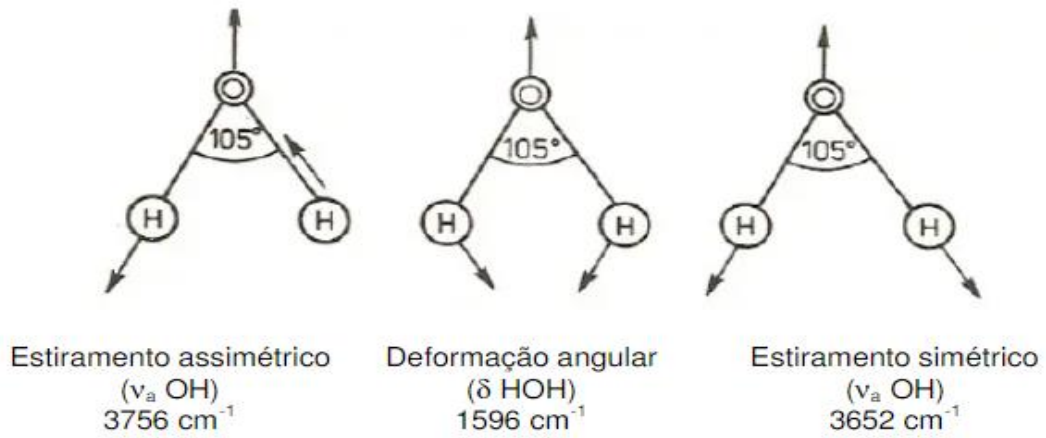
Fonte: Delecave (2011).

Entre o intervalo de  $14290\text{ cm}^{-1}$  a  $200\text{ cm}^{-1}$  do espectro eletromagnético, encontra-se a energia conhecida como infravermelho, que apresenta três regiões: infravermelho próximo (NIR – Near Infrared) no intervalo de onda entre  $14290\text{ cm}^{-1}$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$ ; infravermelho médio (MIR – Middle Infrared) entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  e infravermelho distante (FIR – Far Infrared) entre  $400\text{ cm}^{-1}$  a  $100\text{ cm}^{-1}$ . O formato padrão de um espectro de espectroscopia no infravermelho é a transmitância (% T) versus o número de onda  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ). (BARBOSA, 2011; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

A radiação infravermelha produz alterações nos modos vibracionais da molécula à medida que absorvem energia e como consequência, surgem bandas de absorção formando o espectro infravermelho. Em um modo normal de vibração, os átomos vibram em sincronia, afastando-se ao mesmo tempo de sua respectiva posição de equilíbrio e passando todos ao mesmo tempo pela sua respectiva posição de equilíbrio. Uma frequência correspondente a um modo normal de vibração é chamada de *frequência fundamental* ou *normal* de vibração da molécula. Uma molécula com N átomos, apresenta  $3N$  graus de liberdade. Cada átomo possui 3 graus de liberdade correspondentes as coordenadas do sistema cartesiano (x,y,z), que são fundamentais para definir sua localização. Para moléculas não-lineares, são necessários  $3N-6$  graus de liberdade vibracionais, onde três refere-se à translação e três refere-se à rotação da molécula. Para moléculas lineares, são necessários  $3N-5$  graus de liberdade vibracionais, pois não há rotação em torno de um dos eixos sendo seus núcleos puntiformes. (CANTOR; SCHIMMEL, 1980; SANTOS, 2011; SAKANE *et al.*, 2011; MARIN, 2013).

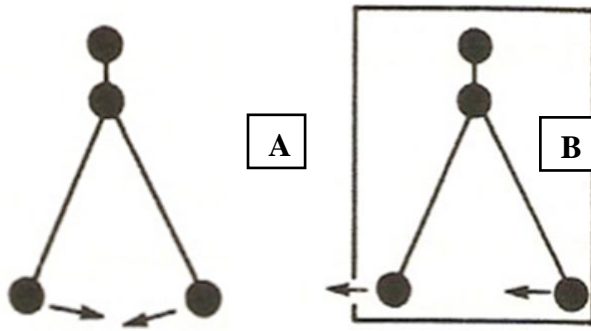
As vibrações das moléculas podem ser denominadas como: estiramentos axiais e deformações angulares. O estiramento é determinado como o aumento e a diminuição alternada da distância internuclear dos átomos envolvidos, que podem ser simétricos ou assimétricos, como exemplificado através dos modos normais de vibrações da água na figura 6. Já as deformações angulares ocorrem quando há alteração no ângulo formado por ligações. Esses modos normais de deformação angular podem estar no plano e fora do plano mostrados nas figuras 7 e 8. (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

Figura 6: Deformação angular e estiramento assimétrico e simétrico da molécula de água.



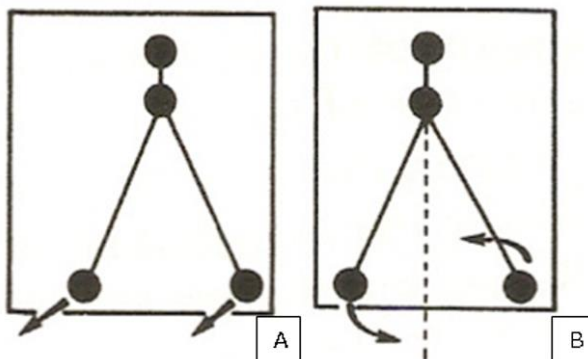
Fonte: Twardowski e Anzenbacher (1994).

Figura 7: Modos de vibração no plano: tesoura (A) e balanço (B).



Fonte: Twardowski e Anzenbacher (1994)

Figura 8: Deformação angular fora do plano: sacudida (A) e torção (B).



Fonte: Twardowski e Anzenbacher (1994).

A interpretação dos espectros não tem uma regra estabelecida a ser seguida, porém o tratamento matemático das vibrações moleculares é muito complexo e considerado pouco prático, no entanto, costuma-se interpretar o espectro a partir de comparações empíricas com outros espectros. Compara-se o espectro de uma substância desconhecida ao de composto padrão. Uma correlação de bandas é uma importante evidência para caracterização das amostras. A posição exata das bandas e alterações em seus contornos revelam detalhes importantes das estruturas moleculares. (SILVERTEIN; WEBSTER; KIELMLE, 2015).

Em uma amostra biológica complexa, como micro-organismos, FT-IR é capaz de caracterizar e discriminar bactérias, identificando compostos biomoleculares como proteínas, lipídeos, biomembranas, carboidratos e material genético. Regiões espectrais de 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  contém bandas de absorção de compostos relacionados a proteínas e lipídios com ligações de grupos C-H; região de 2000-1500  $\text{cm}^{-1}$  contém grupos carbonila (C=O) de proteínas (amida I e II), amino (C=N) e nitrogênio (N=N); grupos carboxílicos de peptídeos surgem em torno de 1650  $\text{cm}^{-1}$  (-C=O) e em 1500  $\text{cm}^{-1}$  (-C-O-); aminoácidos livres e polissacarídeos surgem na região de 1450-1400  $\text{cm}^{-1}$  (COO-) e a região de 1250-1200  $\text{cm}^{-1}$  caracteriza-se por material genético DNA/RNA com aparecimento de grupos fosfatos (PO<sub>2</sub>). A região abaixo de 1500  $\text{cm}^{-1}$  é referida como “impressão digital” e contém informações específicas para discriminação de cepas. (KUMAR; PRASAD, 2012; MAITY *et al.*, 2013; BUNACIU; ABOUL-ENEIN; FLESCHEIN, 2014; BANHARA, 2016).

A Espectroscopia Infravermelha por Transformada de Fourier (FT-IR) tem sido muito utilizada em tipagem bacteriana para discriminação, classificação e identificação de micro-organismos em diferentes níveis taxonômicos, como gênero, espécies e linhagens, baseando-se nos diferentes modos vibracionais das ligações covalentes entre os átomos das amostras de células bacterianas, induzidas pela absorção da radiação infravermelha. Isto possibilita utilizar a superfície celular bacteriana, como uma espécie de código de barras possibilitando o rastreamento de cepas, representando um aspecto importante na rapidez de identificação e conduta terapêutica antimicrobiana. (HARRISON; BERRY, 2017; DEIDDA *et al.*, 2021).

### 3.10 Análise estatística multivariada

Quando um fenômeno depende de muitas variáveis, é necessário conhecer informações fornecidas pelo conjunto das variáveis. Os resultados de um experimento geralmente envolvem muitas variáveis e muitas vezes, as relações existentes entre as variáveis não são percebidas dificultando a interpretação dos resultados. Torna-se necessária a escolha de variáveis, no entanto esta é, muitas vezes, baseada em critérios subjetivos. (CALLAO; RUISANCHEZ, 2018).

A denominação “Análise Estatística Multivariada” corresponde a muitos métodos que utilizam simultaneamente todas as variáveis na interpretação do conjunto de dados obtidos num experimento. Cada método tem sua fundamentação teórica e sua faixa de aplicabilidade. Devido ao extenso cálculo matemático, exige a implementação computacional dos fundamentos teóricos. (SINGH, 2013).

### 3.11 Análise de agrupamento hierárquico (HCA)

É possível construir agrupamentos entre as amostras conforme suas similaridades, com representação bidimensional na forma de dendrograma obtido por agrupamento hierárquico (HCA). (NUNES,2018)

A análise de agrupamento hierárquico consiste no tratamento matemático de cada amostra como um ponto no espaço multidimensional. Quando uma determinada amostra é tomada como um ponto no espaço das variáveis, é possível calcular a distância deste ponto a todos os outros pontos, constituindo-se assim uma matriz que descreve a proximidade entre todas as amostras estudadas. (VASCONCELOS, 2020).

Existem várias maneiras de calcular a distância entre dois pontos, a mais conhecida e utilizada é a distância euclidiana. É a aplicação do teorema de Pitágoras,  $d^2 = a^2 + b^2$  em que  $d$  é a distância entre os pontos e  $d$  é a hipotenusa do triângulo retângulo. A matriz de proximidades é construída e baseada nesta matriz, obtém-se um diagrama de similaridade denominado dendrograma na forma de árvore. Os agrupamentos hierárquicos são formados aglomerando matematicamente estes pontos no espaço multidimensional. (MOITA-NETO *et al.*, 2004).

Existem vários algoritmos específicos que representam um modo particular como os cálculos são feitos no computador que usam as informações da matriz de

proximidade para criar dendrograma de similaridade. Quanto maior a proximidade entre as medidas relativas às amostras, maior a similaridade entre elas. O dendrograma hierarquiza esta similaridade de modo que se pode ter uma visão bidimensional da similaridade de todo o conjunto de amostras. (MOITA-NETO, 2004).

### **3.12 Análise de componentes principais (PCA)**

A análise de componentes principais é uma técnica estatística fundamental que pode ser utilizada para redução do número de variáveis. A análise de componentes principais consiste em reescrever as variáveis originais em novas variáveis denominadas componentes principais, através de uma transformação de coordenadas baseada em Álgebra Linear. A projeção das amostras em um espaço descrito por componentes principais é obtida por uma matriz de transformação e conseqüentemente, são obtidas as direções de maior espalhamento destas amostras. (SOUZA; POPPI, 2012; KEMSLEY *et al.*, 1996; WU; MASSART; JONG, 1997).

Quando o interesse é verificar como as amostras se relacionam, ou seja, o quanto estas são semelhantes segundo as variáveis utilizadas no trabalho, destacam-se dois métodos que podem ser utilizados: a Análise por Agrupamento Hierárquico (HCA) e a Análise por Componentes Principais (PCA). O PCA é uma técnica que reduz muitas variáveis correlacionadas em um número menor de novas variáveis não correlacionadas por transformação linear cujo objetivo é explicar a estrutura de variância e covariância por  $n$ -variáveis iniciais aleatórias. Os métodos utilizam todas as variáveis e depois é realizada a redução de variáveis através de critérios objetivos baseados em matemática e estatística. A construção de gráficos bidimensionais ilustrando informação estatística pode ser obtida por PCA. O primeiro componente principal (PC) expressa a maior quantidade de variação no conjunto de dados, o segundo PC representa o segundo fator mais importante da análise restante, e assim por diante. Portanto, para análises de micro-organismos, os PCs podem ser usados para interpretar as suas semelhanças e diferenças. (JAIN; MURTY; FLYNN, 1999; ROGGO *et al.*, 2007; AGUIAR *et al.*, 2018).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Pesquisa - Ensaio *in vitro*

Foi realizado um estudo experimental qualitativo e quantitativo, *in vitro*, do efeito da Terapia Fotodinâmica (TFD) em espécie de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* com curcumina.

Os espectros infravermelhos dos micro-organismos em estudo foram obtidos para verificar o efeito de TFD nos constituintes biomoleculares.

### 4.2 Linhagem microbiana

Foram utilizadas neste trabalho cepas ATCC (American Culture Type Collection) de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 278530™) e *Acinetobacter baumannii* (ATCC®19606™) armazenadas no laboratório de Fotobiologia aplicada à Saúde do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), na cidade de São José dos Campos.

As cepas encontravam-se acondicionadas em freezer a - 20 °C em caldo infusão cérebro e coração (*Brain Heart Infusion* - BHI, marca KASVI, Brasil), com 5% de glicerol.

### 4.3 Reativação das cepas

As cepas de *P.aeruginosa* e *A.baumannii* foram reativadas em temperatura ambiente, e inoculadas em caldo BHI e posteriormente incubadas a 37° C por 24 horas, semeadas em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI, marca KASVI, Brasil) e incubadas novamente.

### 4.4 Preparo do fotossensibilizador (FS)

O fotossensibilizador utilizado para os experimentos foi a curcumina sintética fornecida pela *PDT Pharma* Indústria e Comercio de produtos farmacêuticos. O seu preparo iniciou-se com a pesagem em ausência de luz de 50 mg do FS diluído em um

becker em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) em ambiente estéril. Após esse procedimento adicionou-se 9 mL de álcool etílico 99%. O FS foi filtrado, formando a solução de estoque com a concentração de 5 mg. mL. Para formar a concentração de trabalho estabelecida diluiu-se a 25 µL de solução de estoque em 2475 µL solução fosfato-salino (PBS).

#### **4.5 Experimento de Terapia Fotodinâmica e contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) para *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii***

Após a incubação em caldo BHI, a solução bacteriana foi centrifugada a 3500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e o sedimento bacteriano diluído em solução salina (NaCl) a 0,9 %, de modo a comparar visualmente a turbidez com a escala 10 de McFarland (aproximadamente  $3 \times 10^8$  bactérias por mL).

As amostras foram divididas em 4 tubos correspondentes aos grupos: CTL (controle), CUR (curcumina), IRR (irradiado) e TFD (Terapia Fotodinâmica). O grupo CTL continha somente solução bacteriana, sem adição de FS, o grupo CUR continha solução bacteriana e solução de FS, o grupo IRR continha somente solução bacteriana sem adição de FS e o grupo TFD continha solução bacteriana e solução de fotossensibilizador. Todos os grupos foram centrifugados a 3500 rpm por 15 minutos, e o sobrenadante desprezado.

Nos grupos CUR e TFD foi adicionado 1 mL de solução de trabalho contendo curcumina previamente preparada como descrito no item 4.4, todos protegidos da luz ambiente, para evitar fotodegradação. Nos grupos CTL e IRR foram adicionados 1 mL de solução salina e todos eles homogeneizados vigorosamente. Todos os grupos foram incubados a 37 °C por 20 minutos.

Para experimento de Unidade Formadora de Colônias (UFC/mL), a amostra foi diluída em NaCl a 0,9 % de modo a comparar visualmente a turbidez com a escala 0,5 McFarland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  células/mL). Os grupos foram divididos da mesma forma que o experimento Terapia Fotodinâmica e o mesmo protocolo foi utilizado para este experimento.

#### 4.6 Irradiação da amostra

Após a incubação, os grupos CUR e TFD do experimento Terapia Fotodinâmica, foram transferidos para uma placa de 24 poços, e irradiados em *Biotable* (*Biotable/Biopdi450*) com 48 LEDs com comprimento de onda de 450 nm, densidade de potência de 50 mW.cm<sup>2</sup> e tempo de irradiação de 625 segundos, totalizando densidade energética de 30,6 J .cm<sup>2</sup>.

Após a irradiação, as amostras foram transferidas para seus respectivos tubos para o processo de lavagem com solução salina. Em seguida, as amostras foram preparadas para leitura em FT-IR que serão descritas no item 4.7.

Para o experimento de UFC/ mL, os grupos CUR e TFD foram transferidos para uma placa de 24 poços e irradiados nos mesmos parâmetros. Em seguida, em uma placa de 96 poços, as amostras foram diluídas em PBS até a concentração desejada e alíquotas de 10 µL foram semeadas pela técnica de gotejamento em triplicatas, em placas de Petri com ágar BHI, com posterior incubação em estufa a 37 °C por 24 horas.

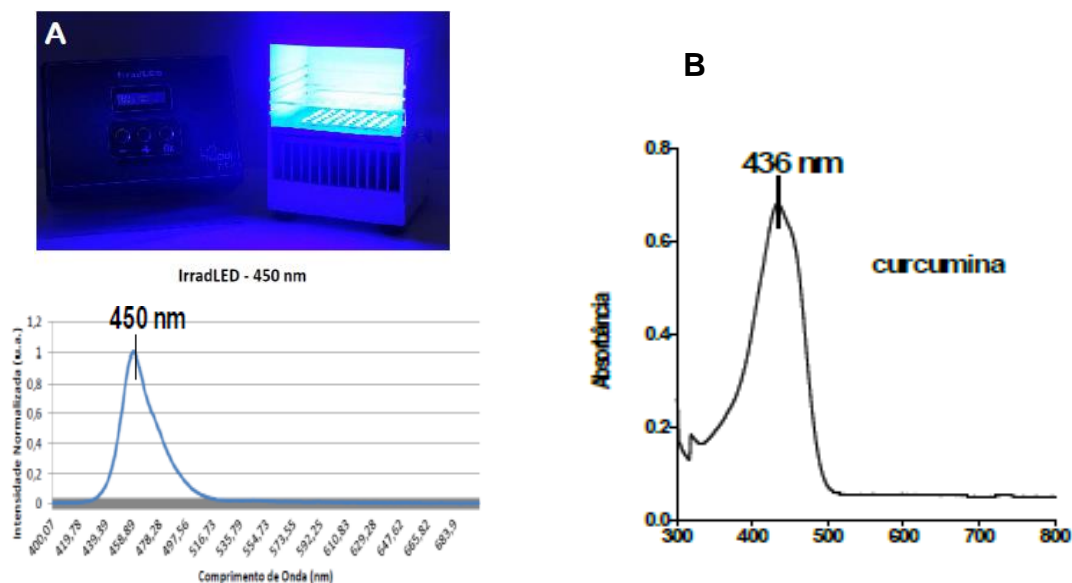
Após a incubação, foi contado o número de colônias presentes em cada placa, aplicando os valores na fórmula seguinte:

$$\text{UFC} = \text{número de colônias contadas} \times \text{fator volume} \times 100 \times \text{fator diluição}$$

Os resultados foram transformados para escala logarítmica de base 10 ( $\log_{10}$ ) e os dados submetidos para análise estatística, usando *software Origin* com ANOVA e TUKEY considerando nível de confiabilidade  $p < 0,05$ . Três experimentos foram feitos independentes em triplicata para garantir a fidelidade dos resultados

A figura 9 mostra imagem representativa do aparelho *Biotable* (*Biotable/Biopdi450*) para irradiação dos grupos CUR e TFD pela luz azul e banda de emissão (A) e espectro de absorção UV-Visível de curcumina (B).

Figura 9: Fonte de luz, banda de emissão (A) e espectro de absorção UV-Visível de curcumina (B)



Fonte: Biopdi (2021).

#### 4.7 Preparação da amostra para Espectroscopia Vibracional do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A solução bacteriana foi depositada em janela de fluoreto de bário e lâminas (substrato transparente no infravermelho) e desidratado a 37°C, para obter uma película transparente. Este processo foi repetido de modo a utilizar toda a massa bacteriana disponível.

#### 4.8 Análise da amostra para espectroscopia (FT-IR)

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Espectroscopia Vibracional no Infravermelho do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), na cidade de São José dos Campos.

Os espectros foram normalizados a 1 unidade de absorção (UA) em relação a amida I ( $\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$ ) dentro da faixa linear do detector MCT (*Mercury Cadmium Telluride*) usando o software *Spectrum 5.3®*.

Espectros de absorção no infravermelho foram obtidos pelo espectrofotômetro *Spectrum Spotlight 400 FT-IR da Perkin-Elmer*. Para cada espectro de FT-IR foram

realizadas 32 varreduras, com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , e a temperatura ambiente foi controlada em  $20^{\circ}\text{C}$ . Todos os espectros eram altamente reprodutíveis e mostravam uma boa relação sinal-ruído. Foram realizados três experimentos independentes, cada um com 60 espectros obtidos, para garantir a fidelidade dos resultados.

Os espectros processados com o *software Spectrum 5.3* foram plotados em gráficos no *software Origin. Pro 8.5*. Posteriormente, a grande quantidade de dados foi submetida a análise de componentes principais (*Principal Component Analysis - PCA*) no *software Minitab 17* para a redução do conjunto de dados à menor matriz ortogonal por meio da covariância dos dados. A matriz obtida foi então submetida a análise hierárquica de grupo (*Hierarchical Cluster Analysis - HCA*) para classificar as variáveis em grupos de acordo com a similaridade estatística dos componentes avaliados. Para a análise de agrupamento foram utilizados os parâmetros: a distância euclidiana para a medida de similaridade; como algoritmo para agrupamento hierárquico, o *Ward*, conhecido como variância mínima que permite agrupar os *clusters* de forma a produzir o mínimo de aumento de variância. Os resultados são mostrados através de dendrogramas.

A figura 10 mostra o espectrofotômetro *Spectrum Spotlight 400 FT-IR* de *Perkin-Elmer* utilizado para análise dos espectros das amostras de cada grupo.

Figura 10: Espectrofotômetro *Spectrum Spotlight 400 FT-IR* de *Perkin-Elmer Spectrum 400*.



Fonte autor.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

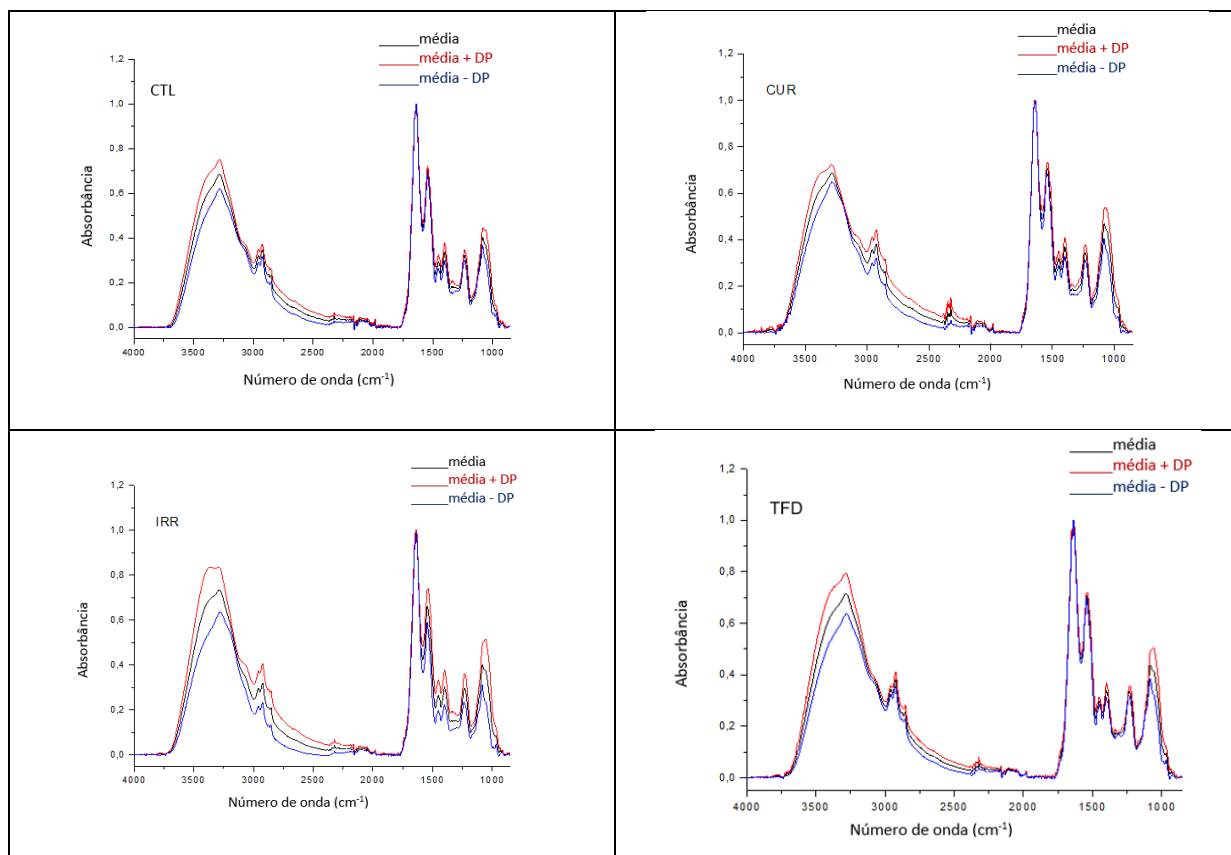
### 5.1 Análise visual dos espectros médios de *Pseudomonas aeruginosa*

Os espectros de *P. aeruginosa* foram obtidos no espectrofotômetro *Spectrum Spotlight 400 FT-IR* de *Perkin-Elmer*, na região espectral de 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ . Para cada espectro de FT-IR foram realizadas 32 varreduras com resolução espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros processados com o *software Spectrum 5.3* incluíram correções de linhas de base, normalização da intensidade espectral e suavização espectral utilizando o algoritmo *Savitzky Golay* (9 pontos), plotados em gráficos no *software Origin Pro 8.5*.

As figura 11, mostra o espectro médio do grupo CTL de *P.aeruginosa* e os tratamentos CUR, IRR e TFD.

Analisando os espectros infravermelhos de *P.aeruginosa*, notam-se que são visualmente idênticos, ou seja, os números de picos e contornos de bandas são semelhantes, e não apresentam aparecimento ou desaparecimento de bandas com diferentes tratamentos. Os baixos valores de desvio padrão (-DP) em cada tratamento indicam a homogeneidade dos espectros em algumas regiões, porém em outras regiões, aumentam (+DP). Como se trata de um tecido biológico complexo, com inúmeros constituintes biomoleculares como fosfolipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, muitos modos normais de vibração se sobrepõem, produzindo alargamento de banda, o que torna difícil sua identificação.

Figura 11: Espectro infravermelho das amostras de *P.aeruginosa* dos grupos controle (CTL), curcumina (CUR), irradiada (IRR) e Terapia Fotodinâmica (TFD) .



Fonte: autor

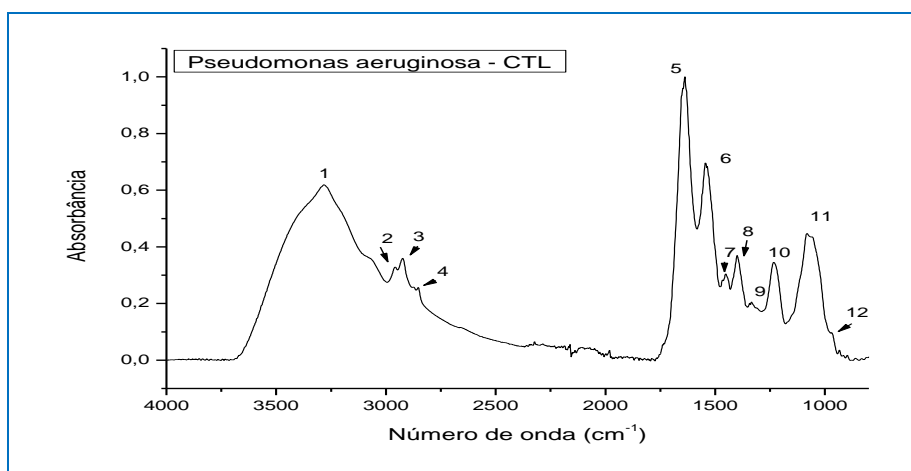
Para obter informações estruturais do complexo sistema biológico bacteriano, torna-se necessário recorrer à cálculos matemáticos e estatísticos. (DAVIS; MAUER, 2010)

O espectro médio no infravermelho da amostra CTL e seus tratamentos em *P.aeruginosa* foi mostrado em absorbância. Analisando visualmente, as maiores bandas sugerem presença de componentes celulares principais como lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Essas bandas principais foram numeradas na figura 12. Todos estes componentes são elementos essenciais comuns para construção de todos os organismos vivos e as análises dos materiais biológicos devem, portanto, focar nos elementos que são específicos e que distinguem um material do outro. (BOMBALSKA *et al.*, 2014) Portanto, essas regiões são utilizadas para escolha de bandas marcadoras que possam contribuir para o estudo da constituição molecular do microrganismo, indicando informações úteis em relação a composição molecular.

Pela inspeção direta dos espectros infravermelhos de CTL sugere-se a presença de lipídios em regiões de 2960,2923,1457,1334  $\text{cm}^{-1}$  e proteínas em regiões de 1611, e 1544  $\text{cm}^{-1}$ . São componentes biomoleculares importantes para formação da parede bacteriana e a diversidade de tipos de lipídeos cria um equilíbrio que regula as propriedades estruturais da biomembrana, além de um ambiente que contém proteínas e outros componentes. A técnica de FT-IR é muito utilizada no estudo das propriedades das membranas, pois os modos vibracionais envolvendo as ligações químicas são muito sensíveis a microambientes e respondem de forma diferentes as alterações do meio fornecendo informações sobre a estrutura molecular e suas interações intermoleculares. (KLAISS-LUNA; MORENO, 2022)

Presença de ácido nucleicos são observados na região 1225 e 1088  $\text{cm}^{-1}$ .

Figura 12: Espectro em absorvância do grupo CTL de *P. aeruginosa* com as principais bandas.



Fonte: autor.

Na interpretação dos espectros, as atribuições de bandas são etapas fundamentais em análise de FT-IR de qualquer amostra biológica, pois a maioria dos espectros bacterianos são muito semelhantes no exame visual simples, e diferenças quantitativas sutis podem estar presentes quando se inspeciona mais detalhadamente. (DAVIS; MAUER, 2010).

Para melhor compreensão, torna-se necessário o estudo das bandas de constituintes biomoleculares e suas atribuições aproximadas dos espectros médios de CTL como mostrado na tabela 1.

Tabela 1 - Número de onda e descrição aproximada dos espectros infravermelhos dos constituintes biomoleculares de *P. aeruginosa*

Picos	Nº de Onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições aproximadas
1	3291	Estiramento da ligação N-H (amida A de proteína)
2	2964	Estiramento assimétrico da ligação C-H em -CH <sub>3</sub> (principalmente em lipídios)
3	2927	Estiramento assimétrico da ligação C-H em -CH <sub>2</sub> – (principalmente em lipídios)
4	2841	Estiramento simétrico da ligação C-H em -CH <sub>3</sub> (principalmente em proteínas e lipídios)
5	1648	Amida I – Estiramento da ligação C=O (80%)
6	1545	Amida II – Deformação angular de N-H (60 %) com estiramento da ligação C-N (40%)
7	1457	Deformação angular assimétrica da ligação C-H em -CH <sub>2</sub> (principalmente lipídios)
8	1396	Estiramento simétrico de COO <sup>-</sup> (ácidos graxos e aminoácidos)
9	1334	Deformação angular simétrica da ligação C-H em –CH <sub>3</sub> (principalmente lipídios)
10	1225	Estiramento assimétrico de PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (principalmente ácidos nucleicos)
11	1088	Estiramento simétrico de PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (ácidos nucleicos e fosfolipídios); estiramento de ligação C-O (glicogênio)
12	966	Estiramento da ligação C-C. C-O em desoxirribose

Fonte: Stuart (1997); Beech (1999).

As bandas de amida I do espectro de *P. aeruginosa* (1648 cm<sup>-1</sup>), consiste em uma banda intensa que surge principalmente pela vibração de estiramento da ligação C=O (80%). São modos acoplados e a vibração de estiramento da ligação C=O corresponde a 80 % do total.

A vibração de estiramento (N-H) dá origem a uma banda larga, amida A, em 3291 cm<sup>-1</sup>.

As principais bandas de absorção de lipídeos são encontradas na região de 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$ , onde as vibrações das ligações C-H de grupos metil e metileno são encontradas. (NOOR *et al.*, 2020).

Os fosfolipídios, presentes na parede bacteriana de *P. aeruginosa*, são divididos em regiões no espectro, originários de vibrações moleculares de hidrocarbonetos, com banda mais intensa em estiramento assimétrico em ligação C-H (2964 e 2923 $\text{cm}^{-1}$ ). A banda aparece novamente em 1457 e 1334  $\text{cm}^{-1}$  devido a vibrações normais de deformações angulares nestas regiões. Seus picos são menos intensos nestas atribuições de bandas, comparados com outros constituintes, como proteínas e lipídios. As regiões correspondentes as bandas 1225, 1088 e 966  $\text{cm}^{-1}$ , observam-se as regiões de ácidos nucleicos, com estiramento simétrico e assimétrico de  $\text{PO}_2$ , estiramento da ligação C-O e estiramento da ligação C-C e C-O em desoxirribose, componentes do material genético do microrganismo.

Um estudo realizado por Xu *et al.* (2021) investigou através da técnica de FT-IR, a detecção e classificação de duas bactérias de origem alimentar, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. Em suas análises, toda a faixa espectral (4000-675  $\text{cm}^{-1}$ ) foram subdivididas em cinco sub-regiões. Uma banda larga com pico em 3300  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento de ligação N-H de amida A de proteínas. A região entre 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente predominantemente por vibrações de estiramento  $-\text{CH}_2$  e  $-\text{CH}_3$  em ácidos graxos. Regiões entre 1700-1500  $\text{cm}^{-1}$  representando contribuições de várias proteínas e peptídeos, como amida I e amida II, com estiramento da ligação C=O. A região de 1500-1200  $\text{cm}^{-1}$  contendo múltiplas contribuições mistas de proteínas, ácidos graxos e compostos que possuem fosfatos, enquanto a região de 1200-900  $\text{cm}^{-1}$  representa o material nuclear (RNA/DNA) com vibrações provenientes de  $\text{PO}_2^-$  em combinação com estiramento C-O-C de polissacarídeos de parede celular.

Um estudo realizado por MAITY *et al.* (2013), identificou e discriminou várias cepas bacterianas, como *Bacillus flexus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, cepa OS<sub>1</sub> e OS<sub>2</sub> pela técnica de FT-IR. Muitos picos foram observados na região de 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  atribuídos a estiramento de C-H, incluindo vários modos de vibração nesta região, como estiramento simétrico do grupo  $\text{CH}_2$ , estiramento simétrico do grupo  $\text{CH}_3$ , estiramento assimétrico do grupo  $\text{CH}_2$  e estiramento assimétrico do grupo  $\text{CH}_3$ . O grupo metileno ( $-\text{CH}_2$ ) e o grupo metil ( $-\text{CH}_3$ ), são grupos dominantes em lipídios e

proteínas respectivamente. A presença de proteína amida I aparece entre 1680-1600  $\text{cm}^{-1}$ . Bandas como estiramento simétrico e assimétrico de grupos fosfatos localizados em 1087 e 1241  $\text{cm}^{-1}$  indicam presença de material genético, DNA, enquanto lipídios aparecem em 1740  $\text{cm}^{-1}$  originado de grupo éster C=O. A intensidade e o formato do pico em 1450  $\text{cm}^{-1}$ , foram diferentes em duas cepas analisadas, enquanto o pico 1313  $\text{cm}^{-1}$  de amida III com estiramento C-N e N-H no plano, foi comum em todas as cepas, representando possivelmente a assinatura bacteriana. Em seu estudo anterior com *Pseudomonas* spp, bandas amidas foram dominantes em 1658/1656  $\text{cm}^{-1}$  (amida I), 1536  $\text{cm}^{-1}$  (amida II) e 1240/1235  $\text{cm}^{-1}$  (amida III). Deformação dos grupo N-H de amidas associadas a proteínas da banda amida II em 1540  $\text{cm}^{-1}$  e banda amida I em 1650  $\text{cm}^{-1}$  foram observadas em *P. aeruginosa*.

As bandas analisadas e suas atribuições aproximadas são semelhantes nos estudos com micro-organismos referidos acima e no presente estudo. Porém, um ponto importante é que mesmo semelhantes, a atribuição de bandas é uma característica particular em um espectro infravermelho de uma amostra biológica, tornando-se parâmetro de referência, pois os valores variam entre diferentes amostras analisadas e dependem de suas características, onde a composição molecular varia de espécie para espécie até mesmo em cepas. Portanto, cada bactéria terá um espectro único e característico. Para facilitar a interpretação dos espectros, já que a maioria dos espectros bacterianos são muitos semelhantes, recorre-se a Análise Estatística Multivariada. (NOOR *et al.*, 2020; DAVIS; MAUER 2010).

Para a Análise Estatística Multivariada dos espectros de *P. aeruginosa* em grupos CTL, CUR, IRR e TFD, aplicou-se Análises de Componentes Principais e de *Cluster* Hierárquico.

## **5.2 Aplicação da Análise Estatística Multivariada para espectros de *Pseudomonas aeruginosa*.**

As Análises de Componentes Principais (PCA) e de *Cluster* Hierárquico (HCA), foram realizadas para identificar possíveis diferenças entre os espectros de CTL, IRR, CUR e TFD de *P.aeruginosa*.

O objetivo é verificar como os grupos se relacionam, ou seja, o quanto são semelhantes segundo as variáveis utilizadas no estudo. Como os espectros são

visualmente semelhantes, torna-se necessário recorrer a cálculos estatísticos para a diferenciação. Estes dois métodos têm a capacidade de analisar a vasta distribuição espectral e discriminar completamente os espectros de diferentes amostras que mostram poucas alterações. (SINGH *et al.*, 2012).

Utilizou-se as regiões de 3600 a 2800  $\text{cm}^{-1}$  e 1800 a 800  $\text{cm}^{-1}$  dos espectros infravermelhos, excluindo as regiões de 4000 a 3600  $\text{cm}^{-1}$  e 2800 a 1800  $\text{cm}^{-1}$  por apresentarem muitos ruídos instrumentais que não apresentam informações estruturais importantes.

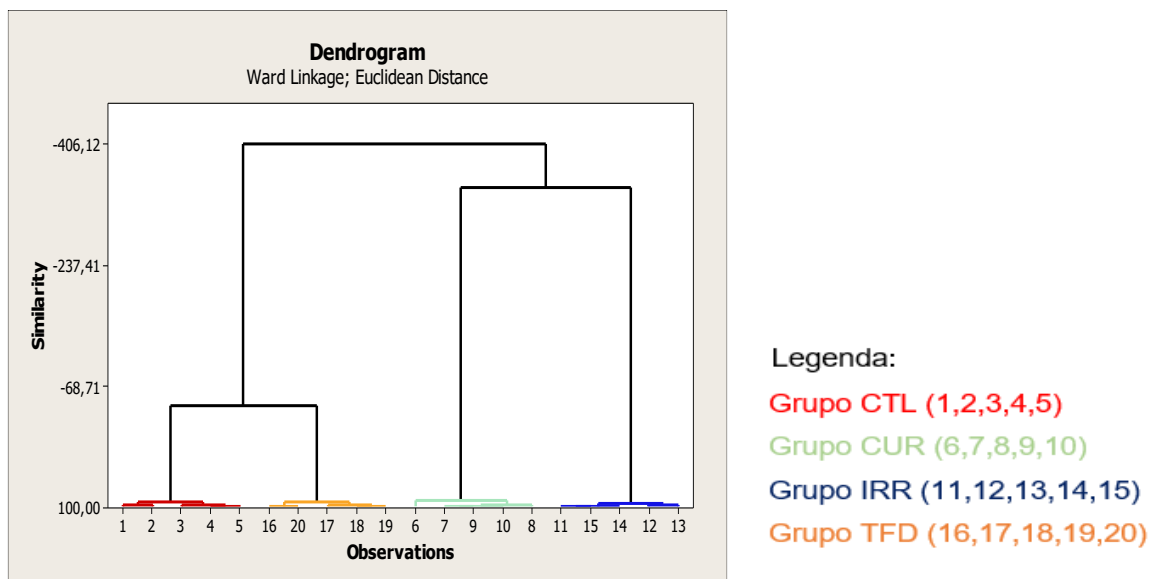
Com o cálculo do coeficiente de dissimilaridade através do método *Ward*, calculou-se a distância euclidiana e *clusters*, que através da Análise por Componentes Principais (PCA) e Análise de *Clusters* Hierárquico (HCA), estabeleceu-se um diagrama que une os elementos conforme similaridade, o dendrograma.

O algoritmo de *Ward* funde aqueles dois *clusters* que produzem o menor aumento de variância ou erro da soma dos quadrados dentro de um novo *cluster* e, portanto, constroem os grupos mais homogêneos. A variância ou soma do erro é calculada como a soma das distâncias quadradas de cada membro do *cluster* ao centro do *cluster*. (DZIUBA *et al.*, 2007).

Foram analisados 5 espectros de cada grupo da bactéria *P.aeruginosa*, mostrando perfeita separação da amostra CTL em relação aos demais tratamentos, como mostrado na figura 13, 14 e 15. Três experimentos foram realizados independentes, com o mesmo protocolo para garantir a fidelidade dos resultados.

Na figura 13, visualizam-se os *clusters* formados através do dendrograma para diferenciação dos grupos CTL, IRR, CUR e TFD de *P.aeruginosa*.

Figura 13 Dendrograma dos espectros de CTL, IRR, CUR e TFD de *P. aeruginosa* correspondente ao experimento N=1.



Fonte: autor

O dendrograma mostra que houve separação entre os grupos, ou seja, houve discriminação dos espectros das amostras de CTL, CUR, IRR e TFD. Apesar da complexa estrutura do microrganismo, com inúmeros constituintes biomoleculares, o algoritmo foi capaz de discriminar os espectros de todos os grupos.

Para o experimento N=1, os grupos CTL e TFD formam o primeiro *cluster*. O grupo CUR e grupo IRR, formam o segundo *cluster*. Observa-se que esta associação, mostra maior grau de dissimilaridade com o primeiro *cluster*. Os espectros de todos os grupos mostram-se homogêneos como mostrado na tabela abaixo. O grau de dissimilaridade é significativamente maior entre os grupos (-406,12%), demonstrando separação entre eles. Os valores negativos indicam que não há similaridade entre os espectros infravermelhos entre os grupos de todos os tratamentos na região analisada.

A Tabela 2 mostra os valores de similaridade entre os grupos CTL, CUR, IRR e TFD de *P. aeruginosa*.

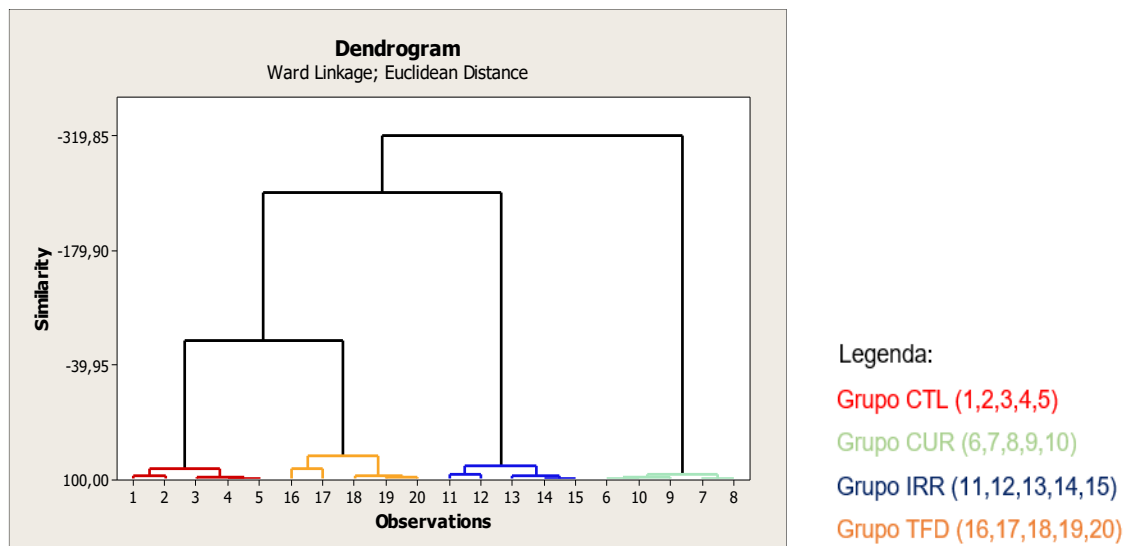
Tabela 2- Valores de similaridade entre CTL, CUR, IRR, TFD de *P. aeruginosa* (N=1).

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> N=1	Similaridade
1 a 5	93,70%
6 a 10	90,44%
11 a 15	95,61%
16 a 20	93,03%
(1 a 5) e (16 a 20)	-42,03%
(6 a 10) e (11 a 15)	-344,99%
[(1 a 5) e (16 a 20)] e [(6 a 10) e (11 a 15)]	-406,12%

Fonte: autor

Os resultados de PCA/HCA na forma de dendrograma mostram a discriminação dos espectros entre os grupos CTL, IRR, CUR e TFD de *P. aeruginosa* correspondente ao experimento N=2, como visualizado na figura 14.

Figura 14: Dendrograma dos espectros de CTL, IRR, CUR e TFD de *P. aeruginosa* correspondente ao experimento N=2.



Fonte: autor

Para experimento N=2, os Grupos CTL e TFD formam o primeiro *cluster*. Junta-se a estes grupos, o grupo IRR. Finalmente observa-se a formação do grupo CUR que se une aos demais grupos. O grupo CUR apresenta maior similaridade entre seus espectros (94,40%), porém o grau de dissimilaridade é maior (-319,85%) entre os

grupos. Observa-se através da tabela abaixo, que os espectros são bem homogêneos.

A Tabela 3 mostra os valores de similaridade entre os grupos CTL, CUR, IRR e TFD de *P. aeruginosa*.

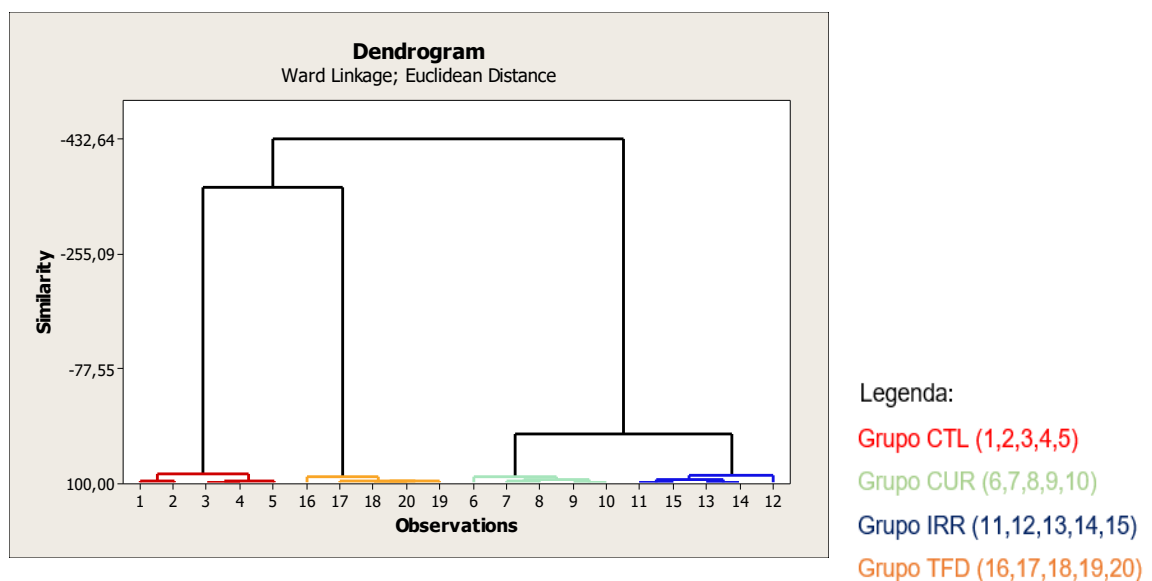
Tabela 3- Valores de similaridade entre CTL, CUR, IRR, TFD de *P. aeruginosa*(N=2)

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> N=2	Similaridade
1 a 5	86,56%
6 a 10	94,40%
11 a 15	83,11%
16 a 20	71,82%
(1 a 5) e (16 a 20)	-68,97%
[(1 a 5)] e [(16 a 20)] e (11 a 15)	-250,25%
[(1 a 5), (16 a 20) e (11 a 15)] e (6 a 10)	-319,85%

Fonte: autor

Os resultados de PCA/HCA na forma de dendrograma mostram a discriminação dos espectros entre os grupos CTL, IRR, CUR e TFD de *P.aeruginosa* correspondente ao experimento N=3, como visualizado na figura 15.

Figura 15 Dendrograma dos espectros de CTL, IRR, CUR e TFD de *P. aeruginosa* correspondente ao experimento N=3.



Fonte: autor

Para experimento N=3, os grupos CUR e o grupo IRR formam um *cluster*, e o grupo CTL e o grupo TFD formam outro *cluster*, porém o grau de dissimilaridade deste grupo é maior (-358,36%) quando comparado ao *cluster* dos grupos CUR e grupo IRR. Porém, todos os grupos formados foram discriminados, não havendo mistura entre os espectros como observado pelo valor de dissimilaridade (-432,64%).

De acordo com a tabela 4, todos os espectros apresentaram homogeneidade. A tabela 4 mostra os valores de similaridade entre os grupos CTL, CUR, IRR e TFD de *P. aeruginosa*.

Tabela 4 - Valores de similaridade entre CTL, CUR, IRR, TFD de *P. aeruginosa* (N=3)

<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> N=3</b>	<b>Similaridade</b>
<b>1 a 5</b>	86,80%
<b>6 a 10</b>	89,41%
<b>11 a 15</b>	85,57%
<b>16 a 20</b>	89,11%
<b>(1 a 5) e (16 a 20)</b>	-358,36%
<b>[(1 a 5) e (16 a 20)] e [(6 a 10) e (11 a 15)]</b>	-432,64%

Fonte: autor

Para experimentos N=1 e N=3, verifica-se a formação de dois agrupamentos: grupos CTL e TFD e grupos CUR e IRR. A dissimilaridade entre os dois agrupamentos é grande. Este padrão de agrupamento não aconteceu no experimento N=2.

Os microrganismos analisados nestes experimentos foram preparados com mesmas condições, no entanto, os resultados de análise estatística mostram que se desenvolvem e se comportam de maneiras diferentes.

Os resultados mostram que a análise estatística multivariada é potencialmente útil para discriminar espectros de *P. aeruginosa* com diferentes tratamentos, podendo ser utilizado para discriminação de cepas, como mostrado no estudo de Dziuba *et al.*, (2007), que aplicou a técnica de FT-IR e análise de agrupamentos para diferenciar e identificar bactérias lácticas de diferentes linhagens de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* em nível de gênero e linhagens de *Lactobacillus* em nível de espécie. Observou-se que os espectros de FT-IR de bactérias pertencentes ao mesmo gênero compartilham características comuns que

lhes permitem diferenciar de espectros de bactérias que representam outros gêneros. A medida de similaridade foi utilizada para a análise, além das análises de *clusters*, que foi uma ferramenta útil para diferenciar bactérias, revelando relações entre seus espectros de FT-IR.

Com a finalidade de analisar o efeito da TFD com curcumina na viabilidade bacteriana em placa de meio de cultura, realizou-se o experimento para contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) para *P. aeruginosa*.

### **5.3 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) de *Pseudomonas aeruginosa*.**

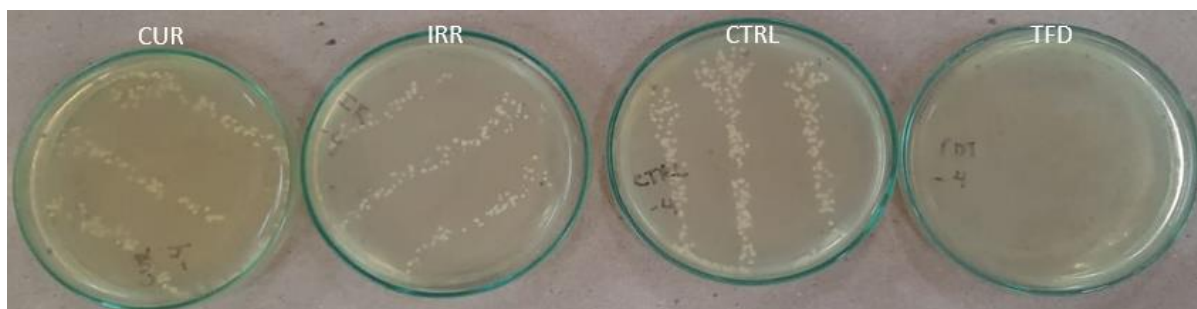
Ao analisar o crescimento bacteriano em placa de meio de cultura BHI do grupo TFD, observou-se redução da viabilidade bacteriana no parâmetro testado (densidade energética de 30,6 J .cm<sup>2</sup>).

Ao comparar os grupos CTL com os grupos CUR e IRR, é possível verificar crescimento padrão em todos os grupos, não apresentando diferenças significativas em relação ao crescimento bacteriano, o que demonstra que apenas o FS do grupo CUR e a luz azul do grupo IRR, não apresentaram citotoxicidade bacteriana nos parâmetros testados.

Estudo realizado por Freitas *et al.* (2019) analisou a viabilidade bacteriana após Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com curcumina em *Staphylococcus aureus* multirresistente. Foi observado que TFD mediada por CUR foi capaz de inibir o crescimento da cepa bacteriana multirresistente nas duas fluências aplicadas (8 e 20 J.cm<sup>2</sup>). Assim, sugere-se que o efeito foto tóxico atribuído à curcumina em contagem de UFC/mL do grupo TFD, pode estar associado à sua característica oxidativa quando exposto em luz azul, aumentando seu efeito, o que torna a curcumina um agente fotodinâmico promissor. (FREITAS *et al*, 2019).

Através da figura 16 observa-se crescimento bacteriano em meio BHI de *P.aeruginosa* dos grupos CTL, CUR e IRR comparados com os grupos TFD após aplicação de Terapia fotodinâmica.

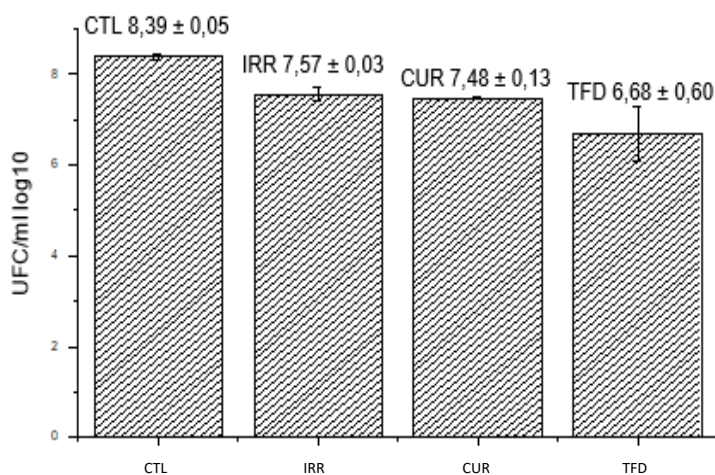
Figura 16: Crescimento bacteriano de *P. aeruginosa* em placa BHI de CTL e tratamentos.



Fonte: autor

A figura 17 mostra a aplicação da Terapia Fotodinâmica em cepas *P. aeruginosa* avaliando Unidade Formadoras de Colônias (UFC/mL  $\log_{10}$ ) através do histograma. Observa-se as médias do grupo CTL e dos tratamentos, juntamente com os respectivos desvios padrão.

Figura 17: Histograma (UFC/mL  $\log_{10}$ ) de *P. aeruginosa*



Fonte: autor

A diferença de 1,71log entre CTL e TFD mostra redução da viabilidade bacteriana em grupo TFD, o que confirma estatisticamente o efeito de morte celular bacteriana mediada por TFD com curcumina, como mostrado na tabela abaixo do teste ANOVA.

O teste ANOVA foi aplicado na amostra CTL e nos diferentes tratamentos como mostrado na Tabela 5. Com base das análises dos resultados estatísticos, foi possível observar que a amostra do grupo CTL comparado aos grupos CUR, IRR e TFD, apresentou diferenças estatísticas. O grupo CUR apresentou diferença estatística com o grupo TFD, porém não apresentou diferença estatística com o grupo IRR. O grupo

IRR apresentou diferença estatística com o grupo TFD. Estes resultados corroboram com os resultados analisados em viabilidade bacteriana através do histograma que confirmam o efeito de morte celular bacteriana da TFD.

Tabela 5 - Resultado de ANOVA para CTL e tratamentos

	CTL	CUR	IRR	TFD
CTL	X			
CUR	Y	X		
IRR	Y	N	X	
TFD	Y	Y	Y	X

Fonte: o Autor

Legenda: Y= há diferença significativa ao nível de significância  $p < 0,05$

N= não há diferença significativa para  $p < 0,05$

X= elemento da diagonal da matriz

Com a finalidade de entender se há diferenças bioquímicas na composição biomolecular após TFD que impeça a viabilidade bacteriana em meio de cultura, a análise das áreas dos constituintes biomoleculares e ajuste de curva de *P. aeruginosa* foi aplicada.

#### 5.4 Cálculo das áreas dos constituintes biomoleculares de *Pseudomonas aeruginosa*.

A deconvolução e ajuste de curva gaussiana foram realizadas, quantificando a contribuição de componentes biomoleculares específicos em regiões dos espectros. Surgem muitas bandas que antes não eram observadas e com os espectros de segunda derivada são identificados os números de ondas das novas bandas.

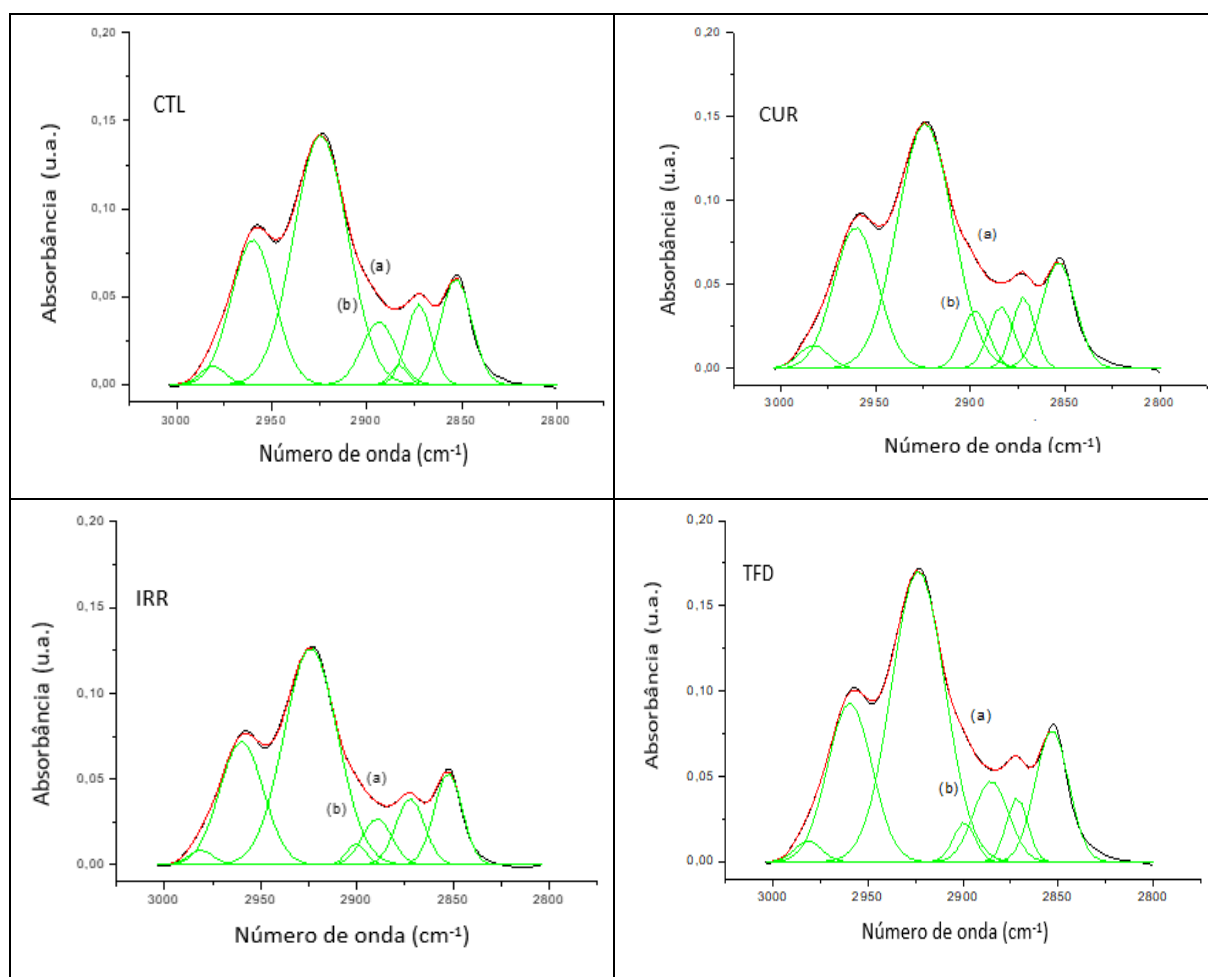
O ajuste de curva foi realizado na região de 3000 a 2800  $\text{cm}^{-1}$ , 1800 a 1480  $\text{cm}^{-1}$ , 1480 a 1350  $\text{cm}^{-1}$  e 1350 a 900  $\text{cm}^{-1}$ . Este método baseia-se no método de mínimos quadrados usando bandas gaussianas e calcula as proporções dos componentes gaussianos das bandas que resultam no espectro teórico com melhor ajuste ao espectro experimental. A partir da soma e ajuste de mínimos quadrados pode-se encontrar a combinação de intensidade e largura de bandas para os componentes de modo que, quando adicionados, reproduzem o espectro observado

experimentalmente. A precisão do ajuste é dada pelo valor do erro quadrático médio e quanto menor este valor, melhor ele se ajusta. (TAREB *et al.*, 2017).

Este método permite analisar mudanças sutis em estrutura de biomoléculas, sob diferentes condições experimentais como mostrado nas figuras 17,18 ,19 e 20.

A figura 18 mostra o espectro original e ajuste de curva da região entre 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  dos grupos CTL, CUR, IRR e TFD. Nesta região, encontram-se principalmente bandas de lipídeos e proteínas.

Figura 18: Espectro FT-IR de todos os tratamentos em regiões entre 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$ . (a) espectro original e (b) ajuste de curva.

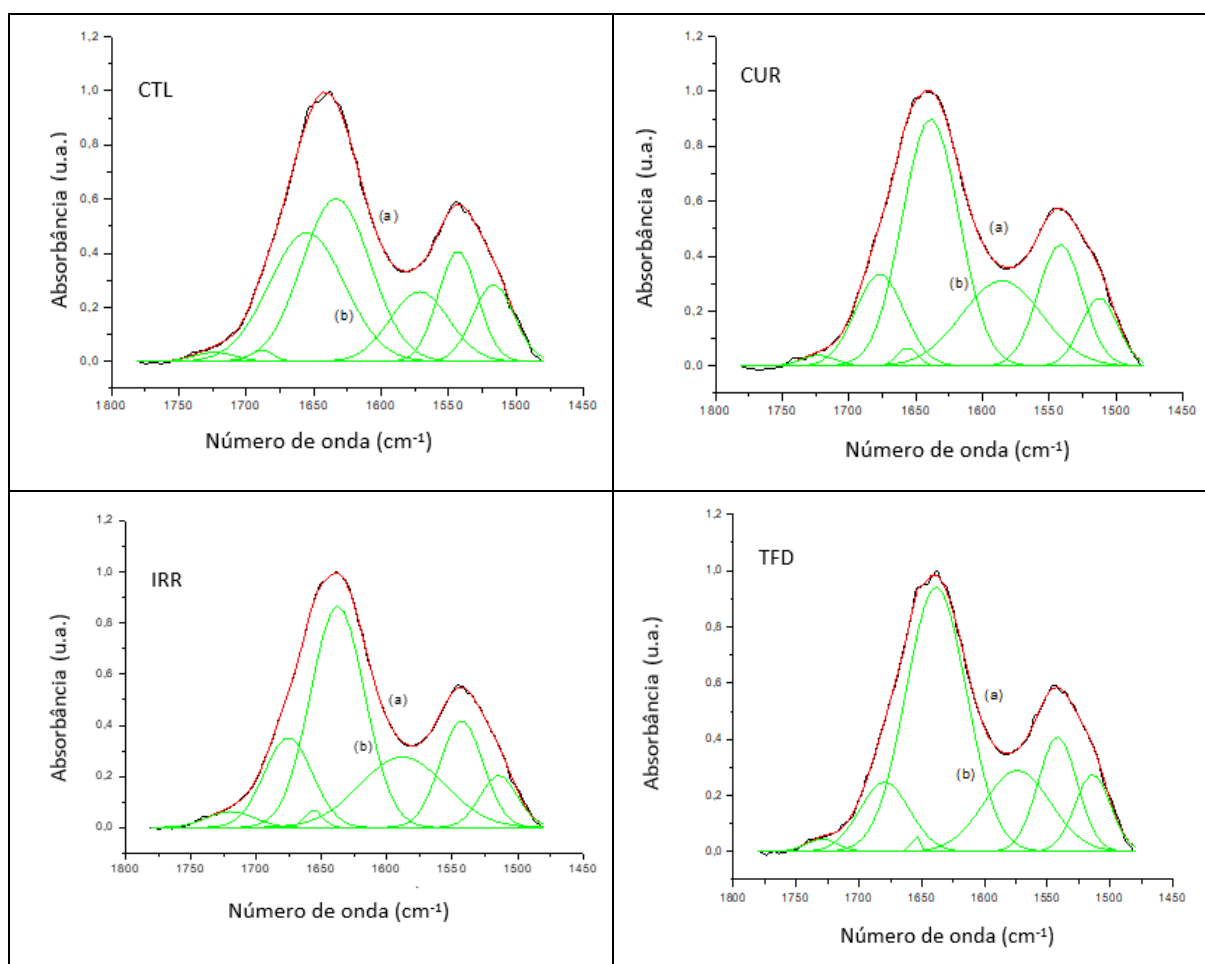


Fonte: autor

A figura 19 mostra o espectro original e ajuste de curva da região entre 1800-1480  $\text{cm}^{-1}$  dos grupos CTL, CUR, IRR e TFD. Nesta região, encontram-se bandas proteínas, relacionadas com vibração de estiramento C=O. A amida I, que é um dos principais componentes de proteínas, possui bandas de absorção nesta região, onde

estuda-se estrutura secundária de proteínas. A absorção de amida II, também encontrada nesta região, é devido à vibração de flexão N-H acoplado ao estiramento C-N, vista em 1500-1560  $\text{cm}^{-1}$ .

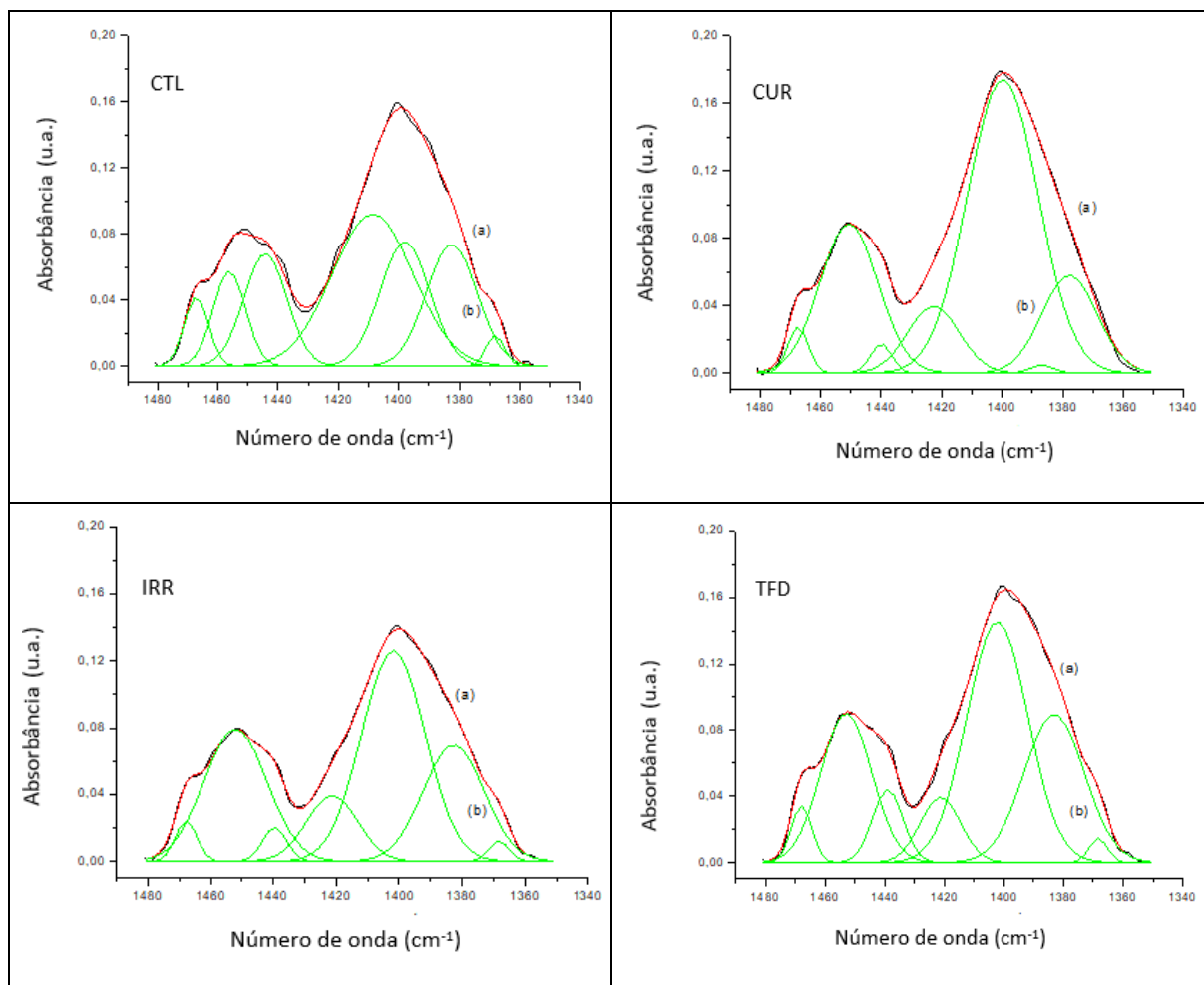
Figura 19: Espectro FT-IR de todos os tratamentos em regiões entre 1800-1480  $\text{cm}^{-1}$ : (a) espectro original e (b) ajuste de curva



Fonte: autor

A figura 20 mostra o espectro original e ajuste de curva da região entre 1480-1350  $\text{cm}^{-1}$  dos grupos CTL, CUR, IRR e TFD. Nesta região, encontram-se bandas de proteínas, como absorção amida III devido ao estiramento C-N e N-H no plano, bandas de lipídeos devido a deformação angular assimétrica de ligação C-H em  $-\text{CH}_2$ , além de estiramento simétrico de grupo carboxila ( $-\text{COOH}$ ) presente em lipídeos e aminoácidos.

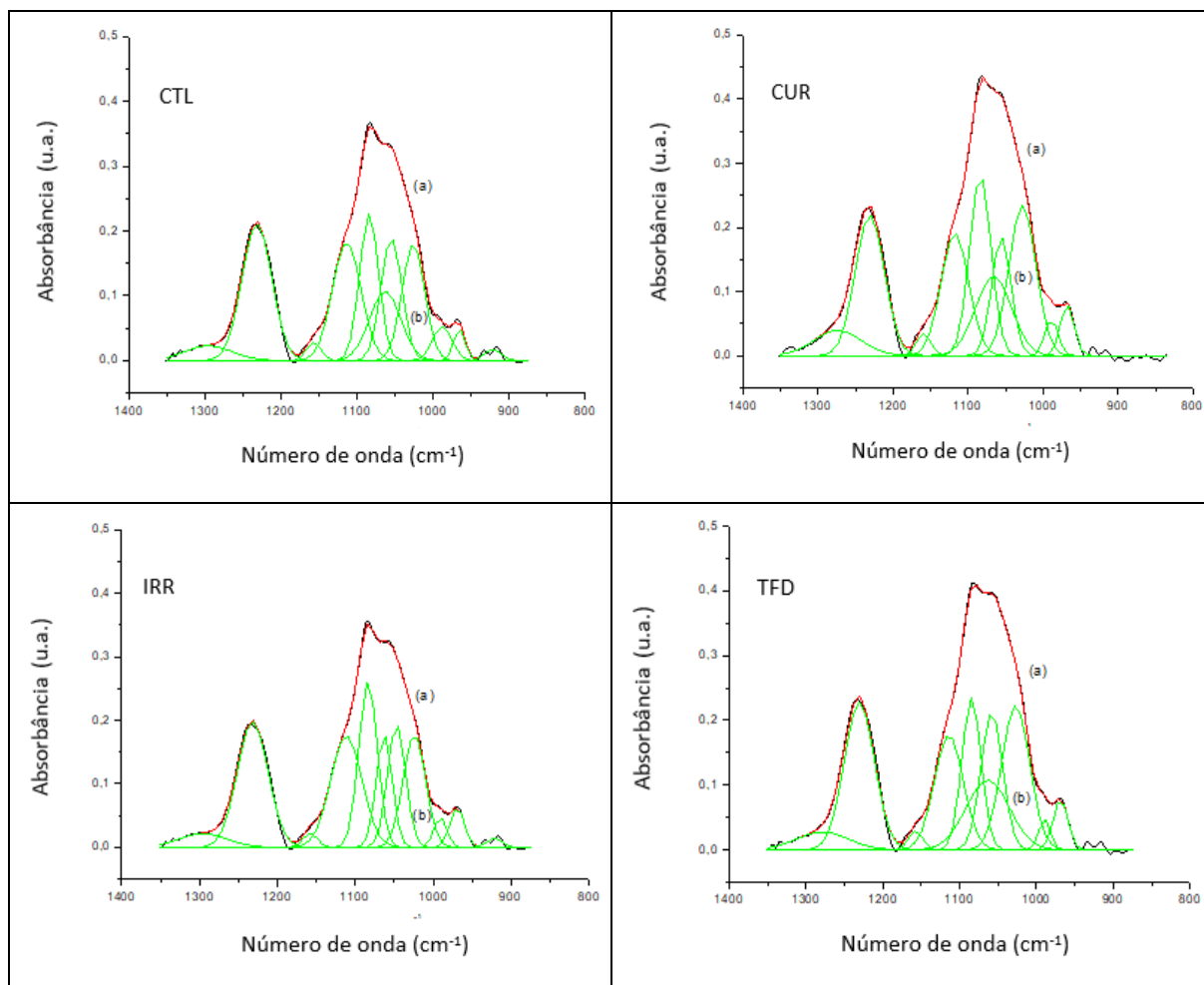
Figura 20: Espectro FTIR de todos os tratamentos em regiões entre 1480-1350  $\text{cm}^{-1}$ : (a) espectro original, (b) ajuste de curva



Fonte: autor

A figura 21 mostra o espectro original e ajuste de curva da região entre 1350-875  $\text{cm}^{-1}$  dos grupos CTL, CUR, IRR e TFD. Nesta região, encontram-se bandas de absorção dos modos vibracionais dos grupos fosfatos e carboidratos. Os ácidos nucleicos são compostos por ligações fosfodiéster que possuem bandas de absorção infravermelha como vibrações de estiramento simétrico e assimétrico de  $\text{PO}_2$ , além de bandas de absorção de carboidratos atribuídas a vibrações de estiramento C-O (glicogênio).

Figura 21: Espectro FT-IR de todos os tratamentos em regiões entre 1350-875  $\text{cm}^{-1}$ : (a) espectro original e (b) ajuste de curva.



Fonte: autor

As tabelas 6,7,8, 9 e 10 apresentam cálculo de área e atribuição de bandas de FT-IR de *P.aeruginosa*:  $\nu$  alongamento;  $\delta$  deformação, as assimétricas, s simétrica de lipídeos, proteínas, conformação secundária de proteínas, material nuclear e carboidratos.

A área sob as curvas referentes aos componentes biomoleculares, foram obtidos como resultado do ajuste de curva para cada número de onda. A área foi calculada, somando todas as áreas sob a curva para cada grupo. (FAGUNDES *et al.*, 2019)

Tabela 6 - Cálculo de área do componente biomolecular lipídeo de grupos CTL, IRR, CUR e TFD e suas atribuições: u, alongamento;  $\delta$  deformação, s, simétrico; as, assimétrico.

Num.	Controle Pico	Controle Área	IRR Pico	IRR Área	CUR Pico	CUR Área	TFD Pico	TFD Área	Atribuição
1	2980,9	0,17723	2981,2	0,13732	2982,8	0,26474	2981,4	0,21838	$\nu_{as}$ (CH)(CH <sub>3</sub> )
2	2960,0	2,3489	2960,0	2,0543	2960,5	2,4552	2959,6	2,7206	$\nu_{as}$ (CH)(CH <sub>3</sub> )
3	2924,2	5,0541	2924,0	4,3967	2924,0	5,3093	2923,6	5,9924	$\nu_{as}$ (CH)(CH <sub>2</sub> )
4	2893,6	0,79905	2900,4	0,15122	2897,4	0,60214	2899,4	0,33499	$\nu_s$ (CH)(CH <sub>3</sub> )
5	2883,0	0,12255	2889,6	0,51509	2883,9	0,60771	2885,3	1,1027	$\nu_s$ (CH)(CH <sub>3</sub> )
6	2872,5	0,74908	2872,4	0,71922	2872,1	0,61974	2871,6	0,52634	$\nu_s$ (CH)(CH <sub>2</sub> )
7	2853,0	1,2391	2852,6	0,97177	2853,6	1,4122	2853,2	1,7064	$\nu_s$ (CH)(CH <sub>2</sub> )
8	1723,5	1,3061	1719,7	2,8344	1723,1	1,2490	1729,6	1,4122	(éster) Carbonila C=O alongamento em fosfolipídios, colesterol e triglicerídeos
9	1467,1	0,41961	1467,8	0,20774	1467,4	0,22970	1467,8	0,29457	$\delta_{as}$ (CH)(CH <sub>3</sub> ) e $\delta_{as}$ (CH)(CH <sub>2</sub> )
10	1456,2	0,77355	1452,1	1,9886	1450,5	2,1545	1452,9	1,9278	$\delta_{as}$ (CH)(CH <sub>2</sub> )
11	1382,5	1,5538	1382,7	1,6878	1386,8	0,0452	1383,2	2,2676	$\delta_s$ (CH)(CH <sub>3</sub> )
<b>Total</b>		14,54307		15,66416		14,94943		18,50398	

Fonte: autor

Tabela 7 - Cálculo de área do componente biomolecular proteína de grupos CTL, IRR, CUR e TFD e suas atribuições:  $\nu$ , alongamento;  $\delta$  deformação, s, simétrico; as, assimétrico.

<b>Num.</b>	<b>Controle Pico</b>	<b>Controle Área</b>	<b>IRR Pico</b>	<b>IRR Área</b>	<b>CUR Pico</b>	<b>CUR Área</b>	<b>TFD Pico</b>	<b>TFD Área</b>	<b>Atribuição</b>
<b>1</b>	1543,3	14,888	1543,0	17,293	1542,3	17,178	1542,0	15,9221	amida II
<b>2</b>	1516,9	10,799	1514,5	7,2795	1514,1	9,9872	1514,0	9,7452	amida II
<b>3</b>	1444,3	1,2219	1439,6	0,19476	1440,0	0,15105	1439,0	0,56167	$\delta_{as}$ (CH)(CH <sub>3</sub> )
<b>4</b>	1408,7	3,0992	1421,3	0,80397	1422,7	0,85254	1421,3	0,66735	$\delta_s$ (CH)(CH <sub>3</sub> )
<b>5</b>	1398,0	1,5516	1401,8	3,1924	1399,8	5,1093	1402,3	3,7466	$\nu_s$ COO <sup>-</sup>
<b>6</b>	1296,2	1,8009	1295,5	1,6746	1273,2	3,1845	1278,9	2,3188	amida III
<b>Total</b>		33,3606		30,44223		36,46259		32,96172	

Fonte: autor

Tabela 8 - Cálculo de área do componente biomolecular conformação secundária de proteína de grupos CTL, IRR, CUR e TFD

<b>Num.</b>	<b>Controle Pico</b>	<b>Controle Área</b>	<b>IRR Pico</b>	<b>IRR Área</b>	<b>CUR Pico</b>	<b>CUR Área</b>	<b>TFD Pico</b>	<b>TFD Área</b>	<b>Conformação secundária de proteínas</b>
<b>1</b>	1688,4	0,89966	1675,5	16,160	1677,1	15,185	1679,6	12,249	amida I ( $\beta$ - folha)
<b>2</b>	1655,1	33,187	1656,2	1,1458	1656,5	1,2324	1654,9	0,48330	amida I ( $\alpha$ -hélice)
<b>3</b>	1633,4	38,012	1637,8	45,109	1638,9	47,764	1638,6	56,732	amidal (desordenada)
<b>Total</b>		72,09866		62,4148		64,1814		69,4643	
<b>Total</b>		107,01306		94,54483		100,68919		104,69362	

Fonte: autor

Tabela 9 - Cálculo de área do componente biomolecular material nuclear de grupos CTL, IRR, CUR e TFD:  $\nu$ , alongamento;  $\delta$  deformação,  $s$ , simétrico;  $as$ , assimétrico.

Num.	Controle Pico	Controle Área	IRR Pico	IRR Área	CUR Pico	CUR Área	TFD Pico	TFD Área	Atribuição
1	1571,8	14,126	1588,2	22,444	1572,4	13,272	1573,9	19,077	$\delta_a$ NH <sub>2</sub> ou $\nu$ (C=N)
2	1368,01	0,14195	1368,3	0,098963	1377,7	1,3286	1368,4	0,11229	$\nu$ (C-N) citosine, guanina
3	1232,2	10,343	1231,8	9,7509	1231,1	10,583	1230,7	11,242	$\nu_{as}$ PO <sub>2</sub> -
4	1085,4	5,0064	1083,6	7,7906	1083,8	9,9970	1084,6	7,3276	$\nu_s$ PO <sub>2</sub> -
5	1062,4	6,3096	1062,9	4,5675	1066,1	7,4284	1063,5	7,5994	$\nu_s$ PO <sub>2</sub> -
6	1056,8	7,5063	1047,1	5,6155	1055,7	5,9314	1058,2	7,4755	$\nu_{C-O}$ , desoxirribose
7	1024,6	6,3994	1024,3	6,3850	1027,5	10,594	1027,2	10,197	$\nu_{C-O}$ , ribose
8	990,23	0,91257	990,99	0,96184	988,83	1,2527	989,61	0,89654	C-C, C-O ribose
9	968,45	1,3916	969,32	1,4417	967,96	1,8419	968,7	1,8689	C-C, C-O desoxirribose
10	921,67	0,47106	921,38	0,33858	936,49	0,25081	936,49	0,16022	DNA helicoidal (Forma Z)
<b>Total</b>		52,60788		59,394583		62,47981		65,95645	

Fonte: autor

Tabela 10 - Cálculo de área do componente biomolecular carboidrato de grupos CTL, IRR, CUR e TFD e sua atribuição: u, alongamento.

<b>Num.</b>	<b>Controle Pico</b>	<b>Controle Área</b>	<b>IRR Pico</b>	<b>IRR Área</b>	<b>CUR Pico</b>	<b>CUR Área</b>	<b>TFD Pico</b>	<b>TFD Área</b>	<b>Atribuição</b>
<b>1</b>	1158,0	0,59740	1157,9	0,49685	1159,2	0,83444	1157,6	0,67160	U (C-O) glicose, frutose
<b>2</b>	1112,0	9,5618	1111,5	8,8456	1117,6	8,7620	1114,2	8,31511	U (C-O) dissacarídeos, sucrose
<b>Total</b>		10,1592		9,34245		9,59644		8,98671	

Fonte: autor

Ao comparar o grupo TFD com o grupo CTL, observa-se aumento discreto de área de lipídeos nos picos 2981, 2959, 2923, 2853 e 1729  $\text{cm}^{-1}$ , onde as vibrações das ligações C-H de grupos metileno ( $\text{CH}_2$ ) e metil ( $\text{CH}_3$ ) são observadas, além de ligação C=O em fosfolipídios, colesterol e triglicerídeos. Maiores aumentos são observados nas bandas 1452 e 1383  $\text{cm}^{-1}$ . Quando as áreas totais são comparadas, observa-se aumento de área total no grupo TFD de 14,54307 para 18,50398. Nota-se um discreto aumento de área total de lipídeos quando se analisou os grupos IRR e CUR, onde a luz e o fotossensibilizador alteraram sua concentração quando usados de forma independentes, porém a TFD com curcumina, resultou em maior aumento de sua área, sugerindo ação em membrana bacteriana do micro-organismo.

Um estudo realizado por Fagundes *et al* (2019) mostrou o efeito da Terapia Fotodinâmica com fotossensibilizador Azul de metileno em cepas de *Leishmania major*, observados através da técnica de FT-IR com ajuste de curva e cálculo de área. Foi observado que no grupo TFD, houve redução do valor de área total de lipídios diferenciando dos achados com *P. aeruginosa*, onde há aumento de área total de lipídios após TFD com curcumina.

Um estudo realizado por Sakane *et al.* (2021), mostra o efeito de TFD em *Leishmania braziliensis* com fotossensibilizador azul de metileno observados através da técnica de FT-IR com ajuste de curva e cálculo de área. A TFD aumentou a área total de lipídeos após tratamento, corroborando com o presente estudo. A técnica de FT-IR, juntamente com ajuste de curva e cálculo de área possuem alta sensibilidade e especificidade, o que permite a comparação de componentes biomoleculares com micro-organismos diferentes em TFD com diferentes fotossensibilizadores.

De acordo com Zdoniczuk *et al.* (2021), as reações fotoquímicas envolvidas no mecanismo de TFD, resultam em degradação de fosfolipídios insaturados devido a abstração de hidrogênios alílicos desses compostos. As espécies de radicais formadas sofrem alteração com oxigênio para produzir hidroperóxidos lipídicos. A peroxidação lipídica é prejudicial para integridade da membrana, ocasionando perda de fluidez e aumento da permeabilidade iônica e possível inativação de enzimas e receptores de membrana. Proteínas presentes em membrana bi-lipídica estão relacionadas com a manutenção da membrana celular e em condições de estresse oxidativo, ocorre desestabilização destas proteínas por interrupção de suas interações

eletrostáticas entre grupos de cabeça lipídica, resíduos de aminoácidos e ácido graxos. Estes processos podem estar relacionados com o efeito bactericida da TFD.

A espectroscopia FT-IR é uma ferramenta importante para o estudo de proteínas, como conformação e orientação de peptídeos ligados em membrana celular e a determinação do conteúdo da estrutura secundária de proteína é importante para monitorar a estabilidade da estrutura da proteína. A membrana é formada por bicamadas lipídicas contendo estruturas peptídicas importantes para o metabolismo bacteriano, e a análise de seus espectros podem mostrar pequenas alterações. (TAMM; TATULIAN,1997). Deu-se ênfase em duas bandas vibracionais proeminentes da estrutura proteica, banda amida I e II. A banda amida I está centrada em torno de  $1650\text{ cm}^{-1}$  devido a vibração de estiramento da ligação  $\text{-C=O}$ , ligados aos átomos de hidrogênio. A banda Amida II aparece como deformação angular da ligação N-H e estiramento da ligação N-C.

Ao comparar o grupo TFD com o grupo CTL, observa-se aumento de área das bandas  $1542,1402$  e  $1278\text{ cm}^{-1}$ , no entanto, as áreas das bandas  $1514,1439$  e  $1421\text{ cm}^{-1}$  diminuem. Ao analisar as áreas totais, nota-se que as áreas diminuem discretamente em TFD quando comparada ao CTL, porém aumenta pela ação da CUR quando utilizada isoladamente, demonstrando o quanto este micro-organismo é sensíveis aos interferentes externos.

No estudo de Fagundes *et al.* (2019) e Sakane *et al.* (2021), as áreas totais de proteínas aumentam quando aplicado TFD com azul de metileno em cepas de *Leishmania major* e *Leishmania brasilienses*. Mais uma vez, observa-se que a TFD induz mudanças em conformação de proteínas em diferentes micro-organismos e fotossensibilizadores.

A análise de estrutura secundária das proteínas é feita em sua maior parte usando bandas de amida I ( $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ) que correspondem 80% das vibrações de estiramento  $\text{C=O}$  do grupo peptídico, e a frequência desta banda, ou seja, número de onda, depende da natureza de ligação de hidrogênio envolvendo as ligações  $\text{C=O}$  e  $\text{N-H}$  que criam o esqueleto peptídico de uma proteína. As estruturas secundárias adotadas pela proteína consistem na sobreposição de muitas bandas, como exemplo a  $\beta$ - folha e  $\alpha$ -hélice. As bandas de amida II que surgem muitas vezes misturadas com bandas de aminoácidos residuais, derivam principalmente da curvatura  $\text{N-H}$  no plano (40-60% da energia potencial) e da vibração de estiramento  $\text{C-N}$  (18-40%). As

unidades de repetição de polipeptídeo e proteínas dão origem a algumas bandas de absorção de radiação infravermelha características como amida A, B e I-IV. (SANTOS, 2011; KONG; YU., 2007; BARTH, 2007; TAMM; TATULIAN, 1997).

Para o cálculo de área do grupo TFD, observou-se que bandas em 1679 e 1638  $\text{cm}^{-1}$ , referentes a  $\beta$ - folha e amida I (desordenada) respectivamente, aumentaram de área após tratamento com TFD, porém houve maior variação da área em amida I ( $\alpha$  –hélice) de 33,187 (CTL) para 0,4833 (TFD) no pico 1654  $\text{cm}^{-1}$ . Isto mostra o quanto a TFD desestabilizou a estrutura secundária de proteínas ( $\alpha$  –hélice) juntamente com o fotossensibilizador curcumina, atuando efetivamente nesta biomolécula. Em contrapartida, estrutura  $\alpha$  –hélice e  $\beta$ - folha aumentaram em suas respectivas áreas quando aplicada TFD em *L. brasiliensis* com azul de metileno. (SAKANE *et al*, 2021).

Quando analisadas área total de conformação secundária de proteínas do grupo TFD, observa-se diminuição de área. Já no estudo com *L. major* de Fagundes *et al* (2019), a TFD não apresentou efeito significativo em estrutura  $\alpha$  –hélice, ao contrário do que aconteceu com efeito da TFD com curcumina em *P. aeruginosa*, onde a estrutura  $\alpha$  – hélice diminuiu significativamente.

Esses resultados sugerem que a TFD atua de forma efetiva em mudanças de conformação secundária de proteínas, com diferentes fotossensibilizadores e micro-organismos, em especial a estrutura  $\alpha$  –hélice.

A técnica de FTIR é potencialmente útil para trazer uma ampla gama de informações sobre estrutura química e molecular de DNA, que mostra uma impressão digital característica, relacionada a presença ou ausência de características e suas relações com o ambiente, sem destruir o material analisado. Esta técnica mostra grande potencial de análise para material genético de células eucarióticas e procarióticas com base em seu DNA genômico, sendo um método rápido, simples, barato, sensível e preciso para distinção de patógenos bacterianos. (LEE *et al.*, 2019; MARINI *et al.*, 2021; PABKIN *et al.*, 2022).

Os dados espectrais de material genético bacteriano, foram considerados na faixa espectral de 1571-921  $\text{cm}^{-1}$ . Ao analisar as áreas de TFD com as do grupo CTL, observa-se discreta variação quando os grupos são analisados isoladamente. Em relação as áreas totais, há discreto aumento de área no grupo TFD em relação ao controle e aos demais grupos, o que sugere aumento de ácido nucléico, ao contrário

do que ocorreu com *L. braziliensis* (SAKANE *et al.*, 2021), onde a TFD diminuiu concentração de ácido nucléico.

Um estudo realizado por Grinholc *et al.* (2015) demonstrou a importância do dano ao DNA fotoinduzido no mecanismo de foto inativação antimicrobiana em *Staphylococcus aureus*, onde proteínas de membrana e outros constituintes do envelope celular são os principais alvos da oxidação fotodinâmica e a foto clivagem do DNA bacteriano ocorre em células amplamente foto inativadas ou que não são mais viáveis. O dano ao DNA desencadeia a resposta SOS, que é uma via que induz o reparo de DNA e duas proteínas chaves estão envolvidas neste processo: LexA(repressor) e RecA (indutor). Seus resultados mostram que a inibição parcial da resposta SOS resultou especificamente em regulação negativa de RecA ou interrupção do gene RecA e a eficácia do tratamento fotodinâmico pôde ser significativamente aumentado. Essa descoberta sugere que a foto inativação resulta em danos graves ao DNA que leva a morte celular se os sistemas de reparo do DNA forem inibidos.

Neste trabalho, notam-se alterações de componentes do material genético bacteriano através do estudo de suas concentrações, porém, estudos mais aprofundados são necessários para melhor compreensão de morte celular de *P. aeruginosa* por alterações desta biomolécula.

Em análise de área de carboidratos do grupo TFD comparado ao grupo CTL, nota-se diminuição de área, sugerindo que TFD com curcumina reduz o nível de energia bacteriana. Este resultado corrobora com o resultado de Fagundes *et al* (2018), que observou diminuição de carboidrato após TFD com azul de metileno em *L. major*.

Através das análises bioquímicas com FT-IR, observa-se que após TFD com curcumina várias moléculas sofreram alterações, e maiores variações estão em diminuição de estrutura  $\alpha$  –hélice, aumento de amida I desordenadas e amida I  $\beta$ -folha. Quando se analisa a viabilidade bacteriana com os resultados obtidos no experimento de contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL), observa-se redução de células viáveis em meio de cultura quando aplicada TFD com curcumina, demonstrando que a associação de luz e fotossensibilizador juntos, reduzem significativamente o crescimento bacteriano *in vitro*. Quando a luz e o fotossensibilizador são utilizados de maneira independente, não há interferência em

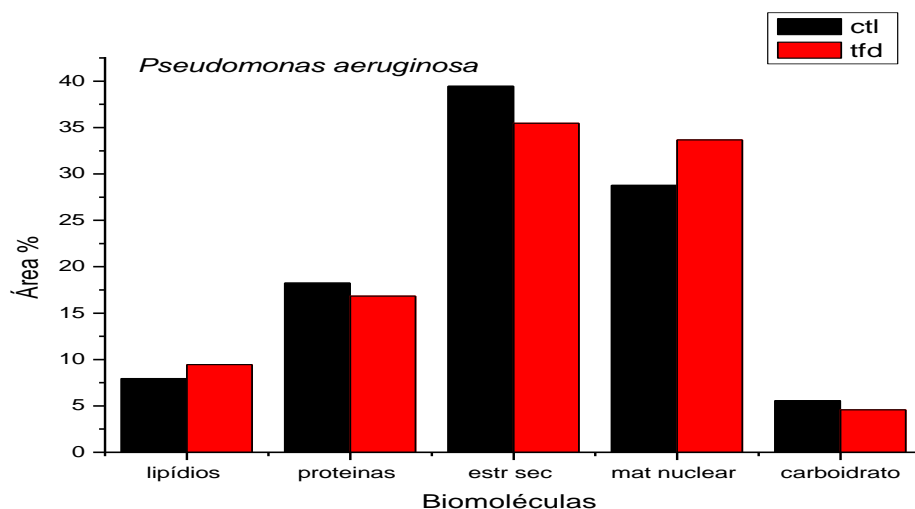
viabilidade bacteriana, porém, ocorrem variações de concentração de lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos, demonstrando que estes micro-organismos são sensíveis aos agentes externos.

Observa-se que as posições de número de ondas dos componentes biomoleculares são muito próximas em grupos CTL, IRR, CUR e TFD, mas suas áreas assumem valores diferentes. Como exemplo, cita-se a conformação de  $\alpha$  –hélice da estrutura secundária de proteína que reduz de 33,187 no grupo CTL em banda 1655  $\text{cm}^{-1}$ , para 0,4833 no grupo TFD, em banda 1654  $\text{cm}^{-1}$ . Como a área se relaciona com a concentração, os resultados dos cálculos indicam quantidades diferentes de constituintes biomoleculares em grupos CTL, IRR, CUR e TFD. Estes resultados podem corroborar com a discriminação entre os espectros de CTL, IRR, CUR e TFD obtida em Análise Estatística Multivariada. De modo geral, o cálculo de área e ajuste de curva contribuem para maior compreensão das alterações bioquímicas após TFD, o que pode facilitar o caminho para a compreensão da TFD para clínica.

Sugere-se que estudo de componentes biomoleculares responsáveis por morte bacteriana com aplicação de TFD com curcumina através de FT-IR continuem em trabalhos posteriores de modo a construir uma base de dados com diferentes micro-organismos, de modo a auxiliar a rápida detecção e identificação de cepas bacterianas resultando em melhor conduta terapêutica por profissionais da área da saúde.

A figura 22 mostra através do histograma, a área em porcentagem das biomoléculas lipídeos, proteínas, estrutura secundária de proteínas, material nuclear e carboidratos após TFD, comparadas com CTL. Observa-se aumento de lipídeos e material nuclear e diminuição de proteínas, estrutura secundária de proteínas e carboidratos. Nota-se a predominância de proteínas juntamente com estrutura secundária de proteínas em relação com outras biomoléculas.

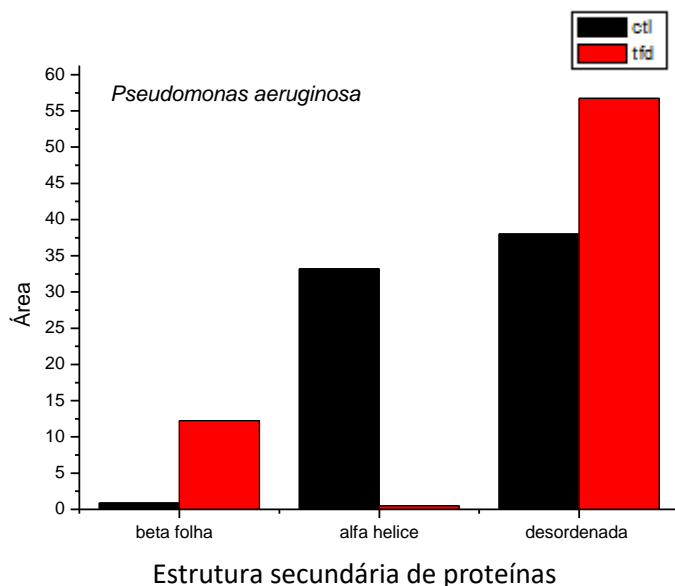
Figura 22: Comparação de área (%) de biomoléculas do grupo CTL e grupo TFD em *P. aeruginosa*.



Fonte: autor

A figura 23 mostra através do histograma, a área de estrutura secundária de proteína como  $\beta$ - folha,  $\alpha$  -hélice e amida I desordenada. A área em vermelho corresponde ao grupo TFD comparado ao grupo CTL em preto. Observa-se maior variação em  $\alpha$  -hélice do grupo TFD comparado ao CTL, assim como aumento de  $\beta$ -folha e amida I desordenada. Amida I desordenada predomina entre os componentes da estrutura secundária de proteínas.

Figura 23: Comparação de área de biomoléculas de estrutura secundária de proteínas após TFD em *P. aeruginosa*



Fonte: Autor.

Com o intuito de analisar as pequenas alterações nos contornos de bandas, deslocamentos sutis, aparecimento e desaparecimento dos picos e intensidades dos mesmos, recorre-se a técnica de segunda derivada, comparando espectros das regiões de TFD e CTL das diferentes biomoléculas.

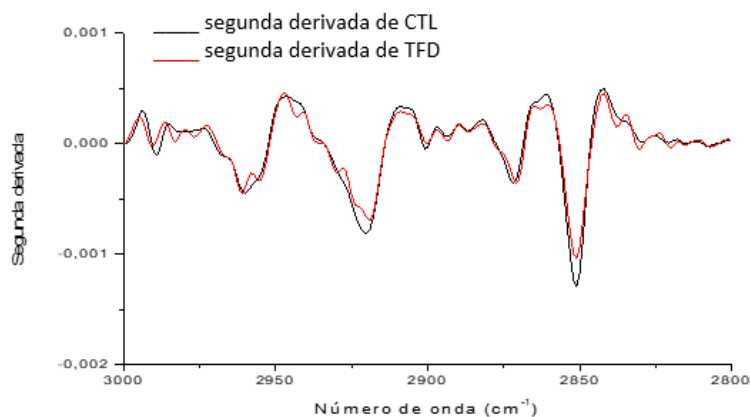
### 5.5 Espectro de segunda derivada de *P. aeruginosa*

Os espectros de segunda derivada mostram pequenas diferenças nos contornos de bandas, contornando o problema de sobreposição de bandas, separando essas bandas e detectando pequenos traços espectrais. Muitos espectros complexos com contornos pouco definidos, podem ser melhorados com a técnica de segunda derivada para facilitar a seleção dos picos. (DONATO *et al.*, 2010)

A figura 24 mostra o espectro de segunda derivada de CTL e TFD de *P. aeruginosa* na região de 3000 a 2800  $\text{cm}^{-1}$ . Observa-se espectros com contornos e intensidades diferentes. Ao analisar o espectro de segunda derivada de *P. aeruginosa* com TFD, as pequenas diferenças nos espectros podem ser mais facilmente

observadas como deslocamento de bandas, diminuição de intensidade e largura de picos.

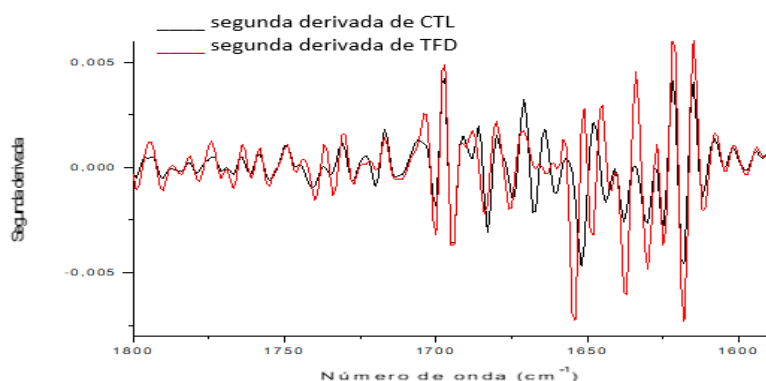
Figura 24: Espectro de segunda derivada mostrando diferença de contornos de bandas de CTL e TFD na região de 3000 a 2800  $\text{cm}^{-1}$  em *P. aeruginosa*.



Fonte:autor

A figura 25 mostra o espectro de segunda derivada de CTL e TFD de *P. aeruginosa* na região de 1800 a 1600  $\text{cm}^{-1}$ . As principais bandas nesta região, sugerem presença de proteínas e fosfolipídios. Observam-se diferenças no contorno e intensidade dos espectros nesta região. O espectro de segunda derivada de TFD permite observar as diferenças entre as bandas de CTL e TFD como aumento de intensidade, definição, deslocamento e alterações de contorno de bandas.

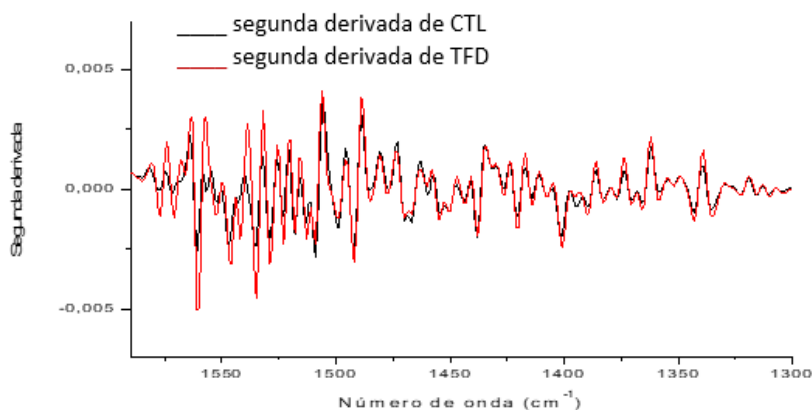
Figura 25: Espectro de segunda derivada mostrando diferença de contornos de bandas de CTL e TFD da região de 1800 a 1600  $\text{cm}^{-1}$  em *P.aeruginosa*.



Fonte: autor

A figura 26 mostra a região de 1550 a 1300  $\text{cm}^{-1}$ . As principais bandas nesta região, sugerem presença de material nuclear, lipídeos e proteínas. Nota-se o aumento de intensidade, definição e deslocamento das bandas após o tratamento com TFD. Em algumas regiões nota-se a diminuição no contorno de bandas e aparecimento de banda.

Figura 26 : Espectro de segunda derivada mostrando diferença de contornos de bandas de CTL e TFD na região de 1550 a 1300  $\text{cm}^{-1}$  em *P. aeruginosa*.

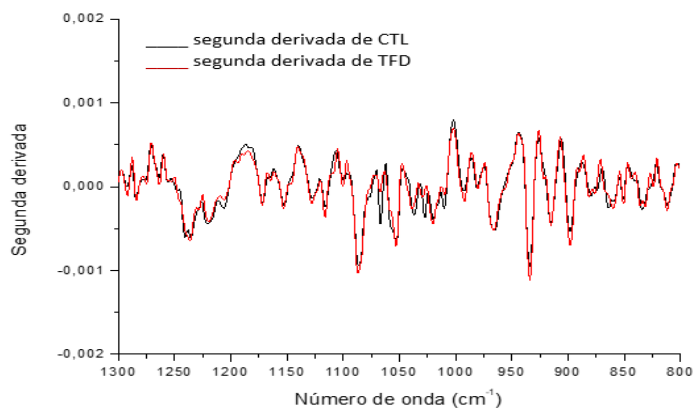


Fonte: autor

A figura 27 mostra o espectro de segunda derivada na região de 1300 a 800  $\text{cm}^{-1}$ . As principais bandas nesta região, sugerem presença de material nuclear. Observam-se as diferenças de contornos de bandas de CTL e TFD nesta região, como aumento e

diminuição de contorno em algumas regiões, além de deslocamento e aparecimentos de bandas.

Figura 27: Espectro de segunda derivada de CTL e TFD mostrando diferença na região de 1300 a 800  $\text{cm}^{-1}$  em *P. aeruginosa*.



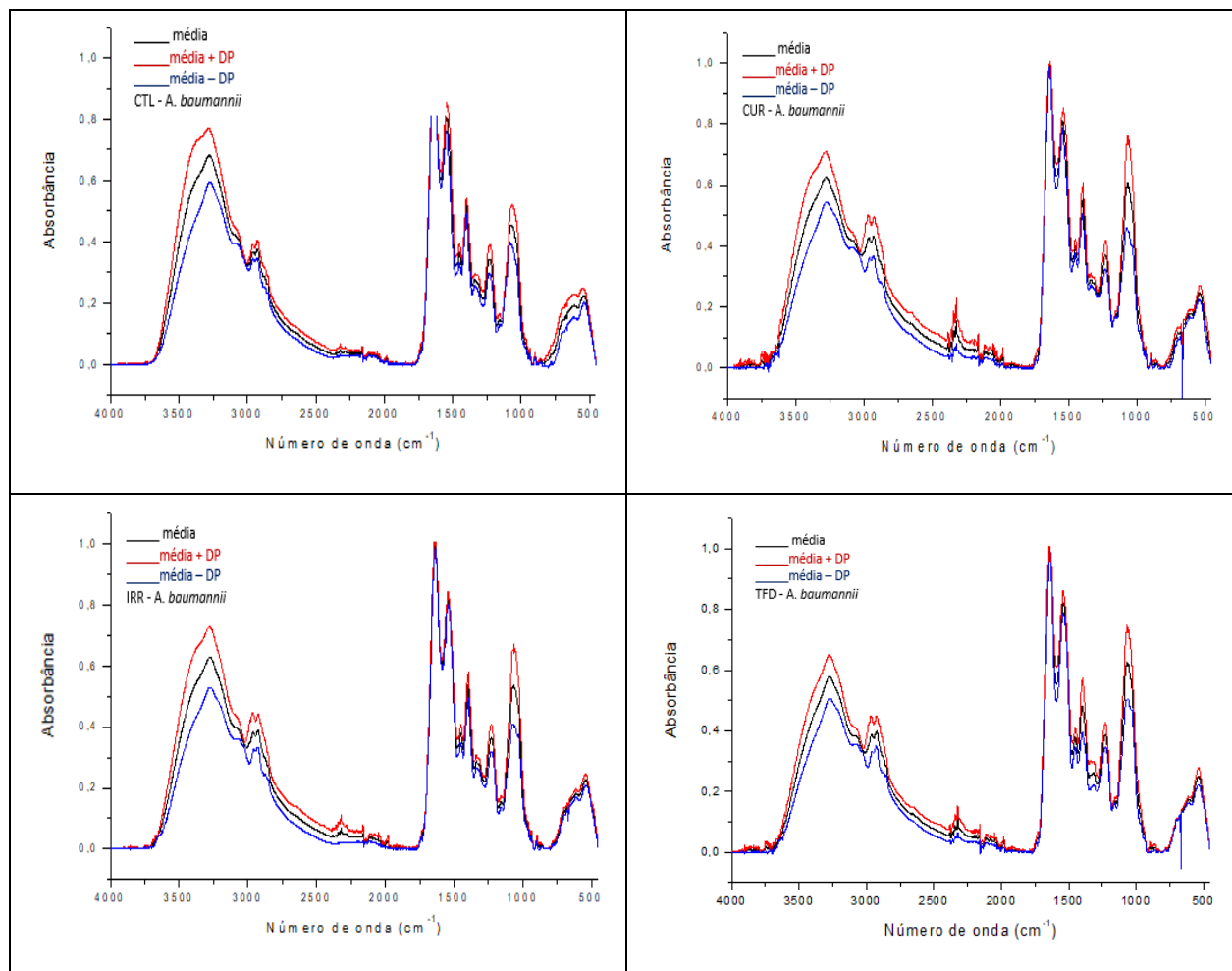
Fonte: autor

## 5.6 Análise visual dos espectros médios de *A.baumannii*.

Os espectros infravermelho médios de *A. baumannii* foram analisados e seus resultados correlacionam-se muito de perto com os resultados relatados para *P. aeruginosa*. Não apresentam aparecimento ou desaparecimento de bandas com os diferentes tratamentos e os baixos valores de desvio padrão (-DP) em cada tratamento indicam a homogeneidade dos espectros, porém em algumas regiões aumentam (+DP).

A figura 28 mostra a média dos cinco espectros infravermelhos do grupo CTL de *A. baumannii* e os tratamentos CUR, IRR e TFD.

Figura 28: Espectro infravermelho da amostra controle (CTL) de *A. baumannii*.

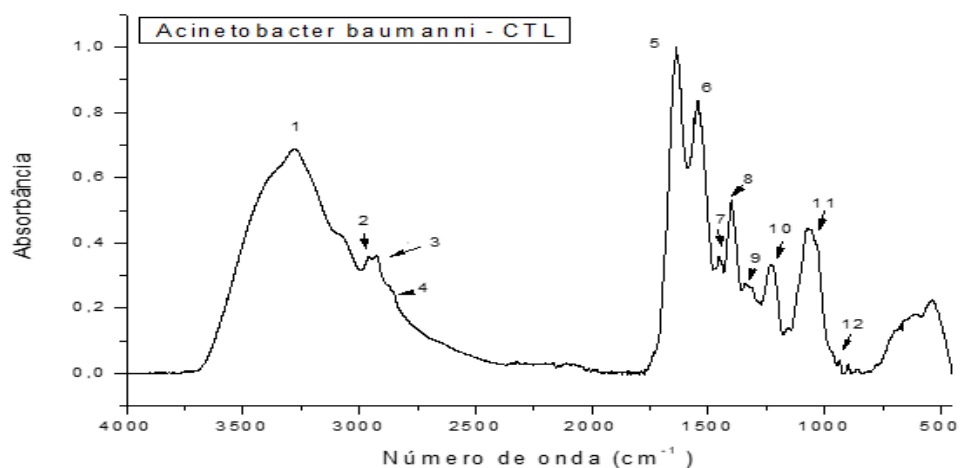


Fonte: autor

As principais regiões foram utilizadas para escolha de bandas marcadoras que possam contribuir para o estudo da constituição molecular do micro-organismo, indicando informações úteis em relação a composição molecular, como lipídeos, proteínas, carboidratos e material nuclear.

O espectro médio no infravermelho da amostra CTL e seus tratamentos em *A. baumannii* foram mostrados em absorbância onde observam-se diferentes intensidades de bandas de absorção e os picos principais foram numerados na figura 29.

Figura 29: Espectro infravermelho de *A.baumannii* do grupo CTL com numeração das bandas principais.



Fonte: autor

Observa-se que as principais bandas em *A. baumannii* são idênticas às de *P. aeruginosa*, com espectros semelhantes devido à composição celular bacteriana. O mesmo acontece com as atribuições de bandas quando se compara os dois microrganismos.

O estudo das bandas dos constituintes biomoleculares e suas atribuições aproximadas dos espectros médios de CTL são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 - Número de onda e descrição aproximada dos espectros infravermelhos dos constituintes biomoleculares de *A.baumannii*.

Picos	Nº de Onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições aproximadas
1	3278	Estiramento da ligação N-H (amida A de proteína)
2	2959	Estiramento assimétrico da ligação C-H em -CH <sub>3</sub> (principalmente em lipídios)
3	2927	Estiramento assimétrico da ligação C-H em -CH <sub>2</sub> - (principalmente em lipídios)
4	2877	Estiramento simétrico da ligação C-H em -CH <sub>3</sub> (principalmente em proteínas e lipídios)
5	1637	Amida I – Estiramento da ligação C=O (80%)
6	1545	Amida II – Deformação angular de N-H (60 %) com estiramento da ligação C-N (40%)
7	1455	Deformação angular assimétrica da ligação C-H em -CH <sub>2</sub> (principalmente lipídios)
8	1399	Estiramento simétrico de COO <sup>-</sup> (ácidos graxos e aminoácidos)
9	1342	Deformação angular simétrica da ligação C-H em -CH <sub>3</sub> (principalmente lipídios)
10	1228	Estiramento assimétrico de PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (principalmente ácidos nucleicos)
11	1073	Estiramento simétrico de PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (ácidos nucleicos e fosfolipídios); estiramento de ligação C-O (glicogênio)
12	935	Estiramento da ligação C-C. C-O em desoxirribose

Fonte: Stuart (1997)

As bandas de amida I (1637 cm<sup>-1</sup>), consiste em uma de banda intensa que surge principalmente pela vibração de estiramento da ligação C=O (80%). Essa mesma banda, aparece no pico 1648 cm<sup>-1</sup>, em espectro de *P. aeruginosa*.

A vibração de estiramento (N-H), dá origem a banda amida A em 3278 cm<sup>-1</sup>, uma banda larga, que também aparece no pico 3291 cm<sup>-1</sup> de *P. aeruginosa*.

Os fosfolipídios e lipídios aparecem como uma banda mais intensa em estiramento simétrico e assimétrico em ligação C-H (2959, 2927cm<sup>-1</sup>). A banda aparece novamente em 1455 e 1342 cm<sup>-1</sup> devido a vibrações moleculares nestas regiões. Observa-se que as mesmas bandas aparecem em espectros de *P.*

*aeruginosa* em 2964 e 2923  $\text{cm}^{-1}$  com as mesmas atribuições, visualizada novamente em 1457 e 1334  $\text{cm}^{-1}$ .

As regiões correspondentes as bandas 1228, 1073 e 935  $\text{cm}^{-1}$ , são as regiões de ácidos nucleicos, com estiramento simétrico e assimétrico de grupo fosfato ( $\text{PO}_2$ ), estiramento da ligação C-O e estiramento da ligação C-C e C-O em desoxirribose, componentes do material genético do micro-organismo. Observa -se que as mesmas bandas aparecem em espectros de *P.aeruginosa* em 1225, 1088 e 966  $\text{cm}^{-1}$ .

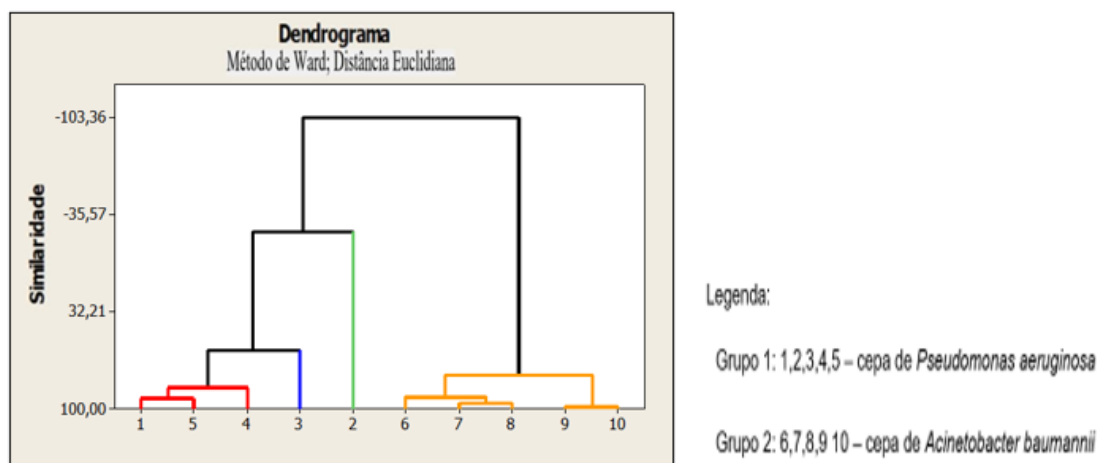
A resolução do equipamento é de 4  $\text{cm}^{-1}$  portanto os números de ondas de muitas bandas têm praticamente os mesmos valores. Torna-se necessário recorrer a Análise Estatística Multivariada para verificar se os dois micro-organismos são estatisticamente diferentes no estudo realizado. Para a Análise Estatística Multivariada dos espectros aplicou-se Análises de Componentes Principais e de *Cluster* Hierárquico.

### **5.7 Aplicação de Análise Estatística Multivariada para discriminação de cepas de *A. baumannii* e cepas de *P. aeruginosa*.**

Para discriminação entre as duas cepas bacterianas, aplicou-se a análise de agrupamentos dos espectros e os resultados dos cálculos de análise de componentes principais (PCA) e análise da *cluster* (HCA) são apresentados na figura 30.

A análise de PCA e HCA foi realizada no *software Minitab* 17, onde a discriminação das cepas pôde ser visualizada através do dendrograma. Utilizou-se as regiões de 3600 a 2800  $\text{cm}^{-1}$  e 1800 a 800  $\text{cm}^{-1}$  dos espectros infravermelhos, excluindo as regiões de 4000 a 3600  $\text{cm}^{-1}$  e 2800 a 1800  $\text{cm}^{-1}$  por apresentarem muitos ruídos instrumentais que não apresentam informações estruturais importantes.

Figura 30- Dendrograma de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* demonstrando sua discriminação.



Fonte: autor

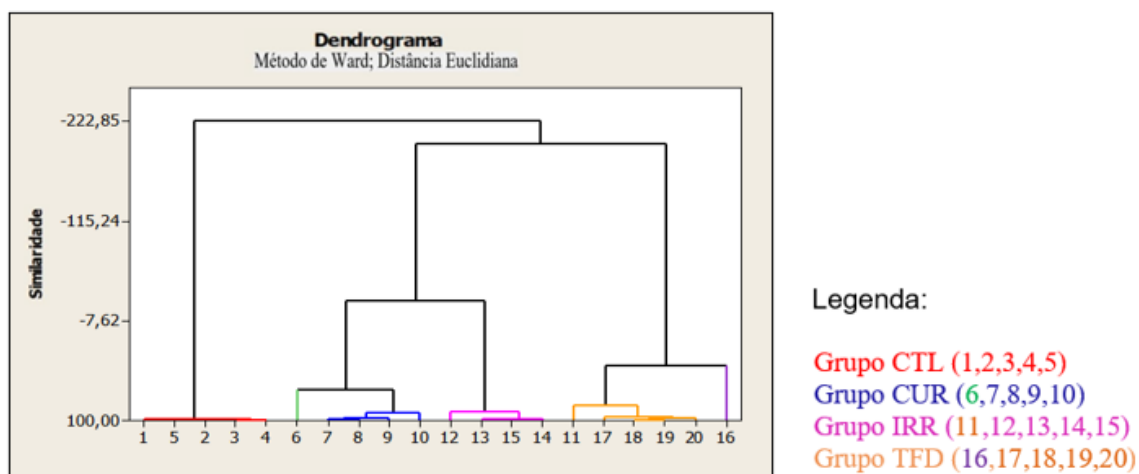
Os espectros de *A. baumannii* apresentam grau de homogeneidade maior comparado com os de *P. aeruginosa*, porém observa-se a perfeita discriminação entre dois micro-organismos e o valor do grau de dissimilaridade (-103,36), indica que estatisticamente não há semelhança estrutural entre eles. Este resultado mostra que, mesmo no caso em que os espectros de diferentes micro-organismos apresentem o mesmo aspecto visual, a Análise Estatística Multivariada é útil para diferenciar os espectros de micro-organismos diferentes.

Portanto, as técnicas espectroscópicas no infravermelho juntamente com métodos quimiométricos como PCA e HCA, mostram grande potencial em identificar e diferenciar os micro-organismos de maneira rápida e simples, comparando-os com base de dados existente, permitindo rápido diagnóstico e tratamento. Como esse método é econômico, rápido e simples, a espectroscopia FT-IR tem sido aplicada com sucesso na identificação e discriminação de várias bactérias em níveis de espécies e cepas. (LEE *et al.*, 2019).

Para análise estatística dos grupos CTL e os demais tratamentos, os espectros de cada grupo da bactéria *A. baumannii* mostraram perfeita separação entre eles.

Na figura 31, 32 e 33 visualizam-se os *clusters* formados através do dendrograma para diferenciação dos grupos CTL, IRR, CUR e TFD de *A. baumannii*. Três experimentos foram realizados independentemente, com o mesmo protocolo para garantir a fidelidade dos resultados.

Figura 31: Dendrograma dos espectros de CTL, IRR, CUR e TFD de *A. baumannii* correspondente ao experimento N=1.



Fonte: autor

Os resultados obtidos através da Análise Estatística Multivariada no experimento N=1, mostram discriminação dos 4 grupos: CTL, CUR, IRR e TFD. Observa-se que o grupo CTL tem os espectros mais homogêneos apresentando 98,21% de similaridade. O grupo CUR apresenta 66,82% de similaridade entre os espectros e este grupo associa-se ao grupo IRR que apresentou similaridade de 90,42% entre seus espectros formando assim o primeiro *cluster*. O segundo *cluster* é formado pela associação do grupo TFD com mistura de espectro do grupo IRR, apresentando heterogeneidade. Desta forma, grupo TFD apresenta 41,24% de similaridade entre seus espectros. Finalmente, o grupo CTL associa-se com todos os *clusters*, apresentando grau de dissimilaridade de -222,85%, discriminando-o de todos os grupos.

A tabela 12 mostra os valores de similaridade entre os grupos CTL, CUR, IRR e TFD de *A. baumannii*. Os valores negativos indicam que não há similaridade entre os espectros infravermelhos entre os grupos de todos os tratamentos na região analisada.

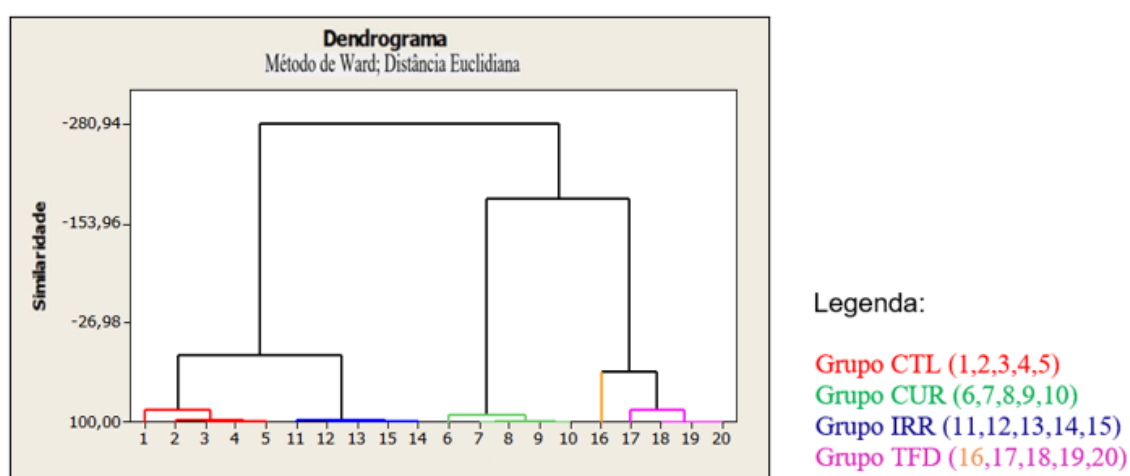
Tabela 12- Valores de similaridade entre CTL, CUR, IRR, TFD de *A. baumannii*. (N=1).

<b><i>Acinetobacter baumannii</i> N=1</b>	<b>Similaridade</b>
1 a 5	98,21%
6 a 10	66,82%
12 a 15	90,42%
11 e 16 a 20	41,24%
(6 a 10) e (12 a 15)	-28,39%
(6 a 10) e (12 a 15) e, (11 e 16 a 20)	-197,92%
(1 a 5) e [(6 a 10), (12 a 15), (11 e 16 a 20)]	-222,85%

Fonte: autor

Os resultados de PCA/HCA na forma de dendrograma mostram a discriminação dos espectros entre os grupos CTL, IRR, CUR e TFD de *A. baumannii* correspondente ao experimento N=2, como visualizado na figura 32.

Figura 32: Dendrograma dos espectros de CTL, IRR, CUR e TFD de *A. baumannii* correspondente ao experimento N=2.



Fonte: autor

Os resultados obtidos através da Análise Estatística Multivariada no experimento N=2, mostram discriminação dos 4 grupos: CTL, CUR, IRR e TFD. Observa-se que os espectros do grupo CTL apresentam 84,42% de similaridade e o grupo IRR apresenta 90,93% de similaridade entre os espectros. Os dois grupos associam-se formando o primeiro *cluster*. O grupo CUR, apresentando similaridade de 90,94% entre seus

espectros associa-se ao grupo TFD formando o segundo *cluster*. Este grupo apresentou 35,83% de similaridade entre seus espectros, sendo o grupo menos homogêneo, pois houve mistura com espectro do grupo IRR. Mesmo assim, a associação do grupo CUR e TFD, demonstrou a presença de CUR nestes dois grupos, o que não aconteceu no experimento N=1, onde o grupo CUR associou-se ao grupo IRR.

Esta diferente associação dos espectros com grupos distintos, demonstra o quanto estes micro-organismos se comportam de maneira diferente, mesmo quando submetidos às mesmas condições de análises e protocolo.

O grau de dissimilaridade entre os grupos é de -280,94%, indicando que não há semelhança entre os espectros demonstrando heterogeneidade entre os grupos.

A tabela 13 mostra os valores de similaridade entre os grupos CTL, CUR, IRR e TFD de *A. baumannii*. Os valores negativos indicam que não há similaridade entre os espectros infravermelhos entre os grupos de todos os tratamentos na região analisada.

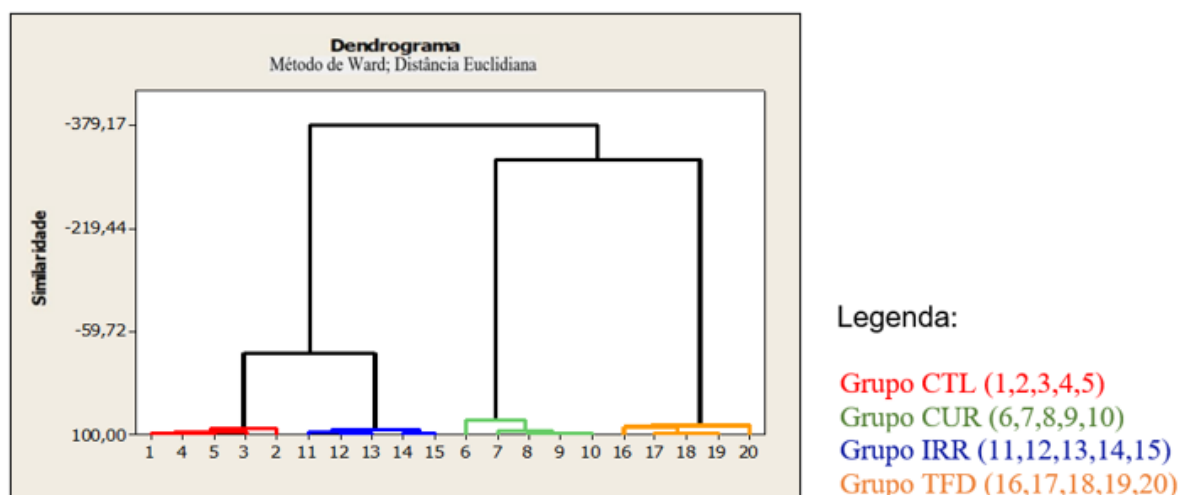
Tabela 13 - Valores de similaridade entre CTL, CUR, IRR, TFD de *A. baumannii* (N=2)

<b><i>Acinetobacter baumannii</i> N=2</b>	<b>Similaridade</b>
<b>1 a 5</b>	84,42%
<b>6 a 10</b>	90,94%
<b>11 a 15</b>	96,15%
<b>16 a 20</b>	35,83%
<b>(1 a 5) e (11 a 15)</b>	-15,05%
<b>(6 a 10) e (16 a 20)</b>	-185,71%
<b>(1 a 5) e (11 a 15), (6 a 10), (16 a 20)</b>	-280,94%

Fonte: autor

Os resultados de PCA/HCA na forma de dendrograma mostram a discriminação dos espectros entre os grupos CTL, IRR, CUR e TFD de *A. baumannii* correspondente ao experimento N=3, como visualizado na figura 33.

Figura 33: Dendrograma dos espectros de CTL, IRR, CUR e TFD de *A. baumannii* correspondente ao experimento N=3.



Fonte: autor

Os resultados obtidos através da Análise Estatística Multivariada no experimento N=3, mostram discriminação dos 4 grupos: CTL, CUR, IRR e TFD. Observa-se através do dendrograma, distribuição mais homogênea entre os espectros, onde não houve associação de nenhum espectro com os de grupos diferentes.

O grau de dissimilaridade entre CTL, CUR, IRR e TFD é -379,17 portanto estes 4 grupos apresentam os espectros estatisticamente diferentes. Os grupos CTL e IRR formaram um *cluster* e os grupos CUR e TFD formaram outro, mostrando a importância da presença de curcumina no efeito da terapia fotodinâmica, como aconteceu no experimento N=2. Cabe ressaltar que o segundo *cluster* possui maior grau de dissimilaridade com o primeiro, não havendo mistura entre os espectros.

A tabela 14 mostra os valores de similaridade entre os grupos CTL, CUR, IRR e TFD de *A. baumannii*.

Tabela 14 - Valores de similaridade entre CTL, CUR, IRR, TFD de *A. baumannii* (N=3).

<b><i>Acinetobacter baumannii</i> N=3</b>	<b>Similaridade</b>
<b>1 a 5</b>	89,62%
<b>6 a 10</b>	79,02%
<b>11 a 15</b>	92,76%
<b>16 a 20</b>	87,76%
<b>(1 a 5) e (11 a 15)</b>	-24,80%
<b>(6 a 10) e (16 a 20)</b>	-325,35%
<b>(1 a 5) e (11 a 15), (6 a 10), (16 a 20)</b>	-379,17%

Fonte: autor.

De acordo com resultados de Análise Estatística Multivariada do experimento com *P. aeruginosa*, observou-se uma associação diferente, ou seja, o grupo CTL associou-se ao grupo TFD em todos os experimentos (N=1, N=2 e N=3). Já em Análise Estatística Multivariada do experimento com *A. baumannii*, houve uma associação diferente, onde o grupo CTL associou-se com grupo IRR em dois dos experimentos. Porém em um deles, houve mistura de espectro do grupo IRR com os espectros do grupo TFD.

Os micro-organismos analisados nestes experimentos foram preparados sob as mesmas condições, no entanto, os resultados de Análise Estatística Multivariada mostram que se desenvolvem e se comportam de maneiras diferentes. Isto mostra que mesmo nos casos em que os espectros de diferentes micro-organismos apresentem o mesmo aspecto visualmente, as técnicas de PCA/HCA são potencialmente úteis para diferenciar seus espectros.

Para avaliar o efeito da TFD com curcumina em cepas de *A. baumannii*, realizou-se o experimento de contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) em placa de meio de cultura.

## **5.8 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) de *Acinetobacter baumannii***

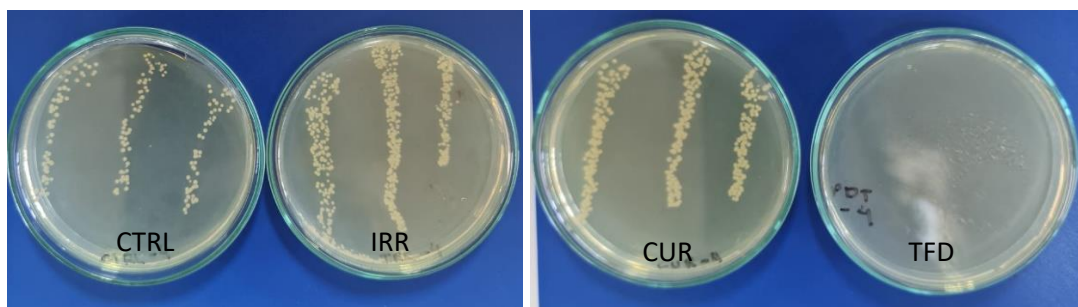
Quando se compara o crescimento bacteriano “*in vitro*” de *A. baumannii* com *P. aeruginosa*, nota-se o mesmo padrão, ou seja, ocorre crescimento nos grupos CUR e

IRR, demonstrando que apenas o fotossensibilizador e a luz não apresentam citotoxicidade bacteriana nos parâmetros testados.

Ao analisar os grupos CTL e TFD é possível verificar crescimento padrão no grupo CTL o que diferencia do crescimento bacteriano com o grupo TFD que apresentou redução significativa de células viáveis. O mesmo padrão ocorreu em *P. aeruginosa*.

A figura 34 apresenta crescimento bacteriano em meio BHI, dos grupos da cepa de *A. baumannii*, após experimento com Terapia Fotodinâmica.

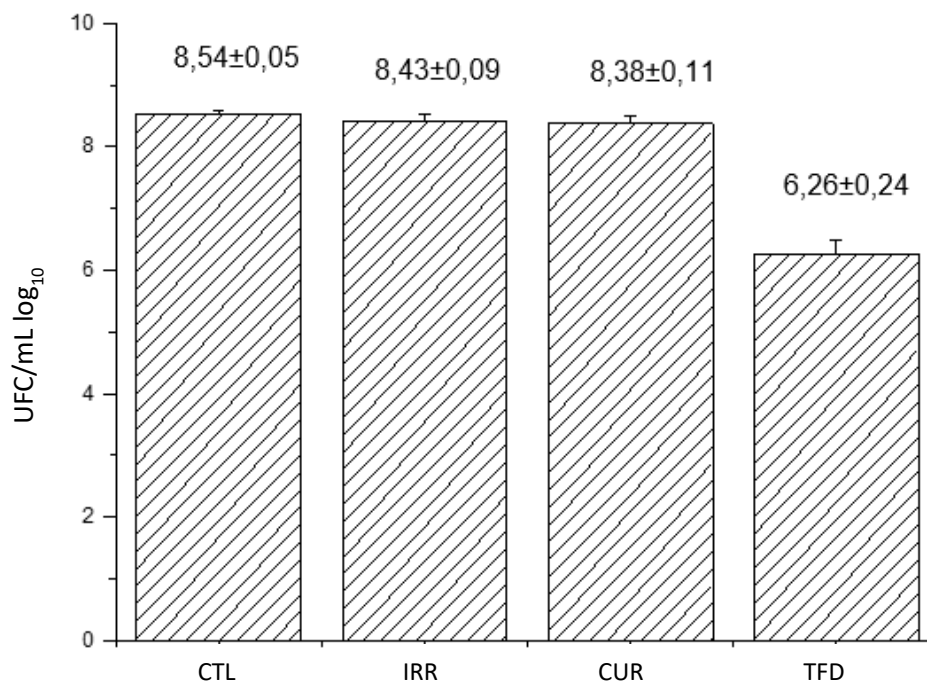
Figura 34: Crescimento bacteriano de *A. baumannii* em placa BHI dos grupos CTL, IRR, CUR e TFD.



Fonte: autor

A figura 35 mostra a aplicação da Terapia Fotodinâmica em cepas *A. baumannii* avaliando Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL  $\log_{10}$ ) através do histograma. Observa-se as médias do grupo CTL, IRR, CUR e TFD, juntamente com os respectivos desvios padrão.

Figura 35: Histograma (UFC/mL  $\log_{10}$ ) de *Acinetobacter baumannii*.



Fonte: autor

A diferença encontrada de 2,28 logs entre o CTL e TFD indica a ação foto tóxica de TFD com curcumina. A diferença de 1,71 logs entre CTL e TFD encontrada em *P. aeruginosa* foi menor comparado com *A.baumannii*, porém houve diminuição significativa em células viáveis como observado na figura 16. Isto confirma que o fotossensibilizador e a luz, quando utilizados isoladamente, não causam diminuição da viabilidade bacterina. A ação foto tóxica somente acontece quando estes componentes estão associados, como em TFD.

O teste ANOVA foi aplicado na amostra CTL e nos diferentes tratamentos como mostrado na tabela 15. A amostra do grupo CTL comparado ao grupo TFD mostrou diferenças estatísticas, mas em relação aos grupos IRR e CUR não houve diferença estatística. O grupo CUR mostrou diferença estatística com o grupo TFD, porém não apresentou diferença estatística com o grupo IRR. O grupo IRR mostrou diferença estatística com o grupo TFD. Nota-se que o grupo TFD mostrou diferenças estatísticas com todos os outros grupos, corroborando com o grupo TFD da cepa de *P.aeruginosa*.

Tabela 15 - Resultado de ANOVA para CTL e tratamentos de *A. baumannii*.

	CTL	CUR	IRR	TFD
CTL	X			
CUR	N	X		
IRR	N	N	X	
TFD	Y	Y	Y	X

Fonte: autor

Legenda:

Y= há diferença significativa ao nível de significância  $p < 0,05$

N= não há diferença significativa para  $p < 0,05$

X= elemento da diagonal da matriz

Com a finalidade de entender se há diferenças bioquímicas na composição biomolecular após TFD que impeça a viabilidade bacteriana em meio de cultura, a análise das áreas dos constituintes biomoleculares e ajuste de curva de *A.baumannii* foi aplicada.

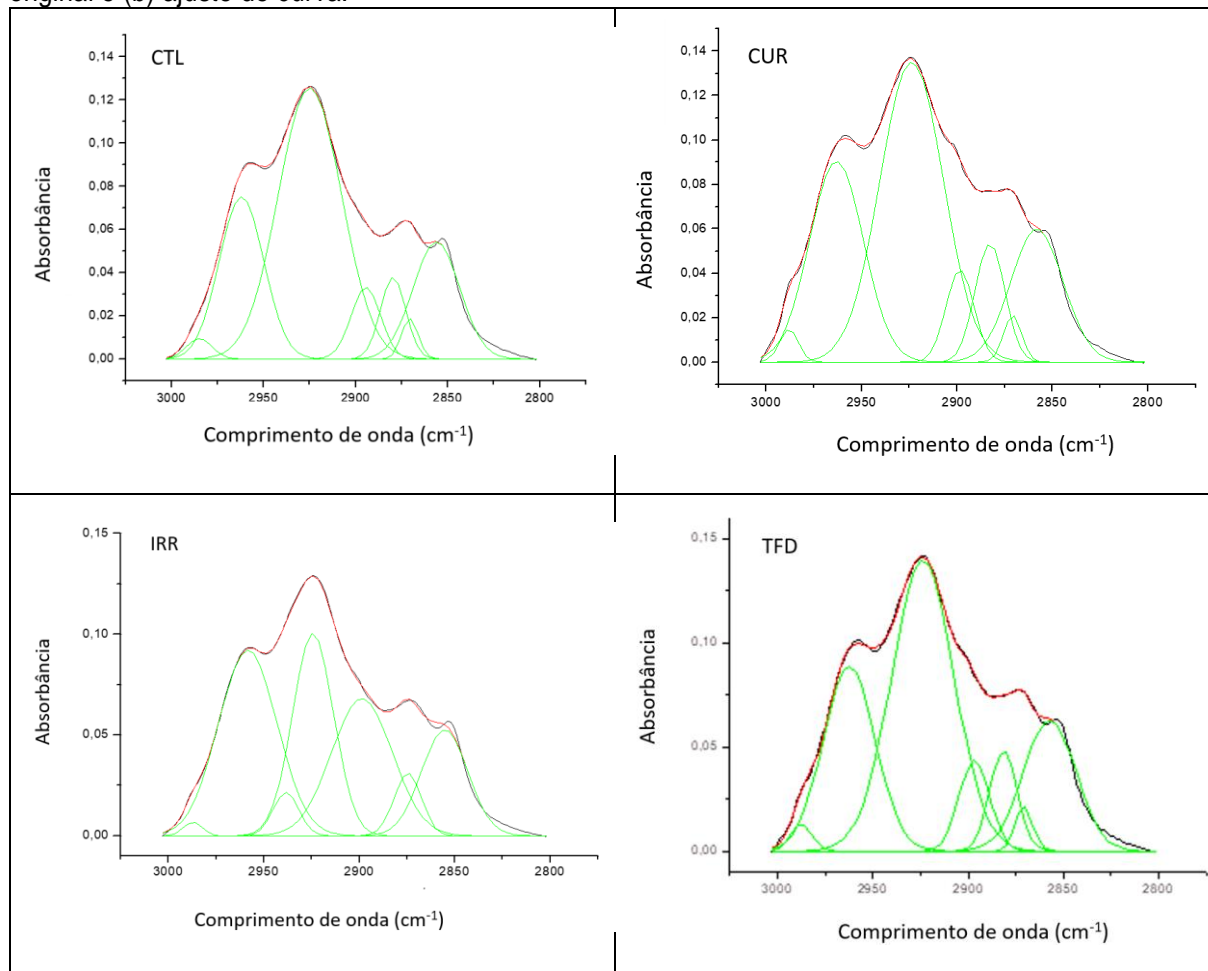
### 5.9 Cálculo das áreas dos constituintes biomoleculares de *Acinetobacter baumannii*.

Foi aplicado o ajuste de curva para as componentes biomoleculares na região de 3000 a 2800  $\text{cm}^{-1}$ , 1800 a 1450  $\text{cm}^{-1}$ , 1500 a 1340  $\text{cm}^{-1}$  e 1400 a 800  $\text{cm}^{-1}$ .

As figuras 36, 37, 38 e 39 mostram os resultados de ajuste de curva utilizando a função gaussiana dos grupos CTL, CUR, IRR e TFD.

A região de 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  contém espectros de lipídios, fosfolipídios e proteínas.

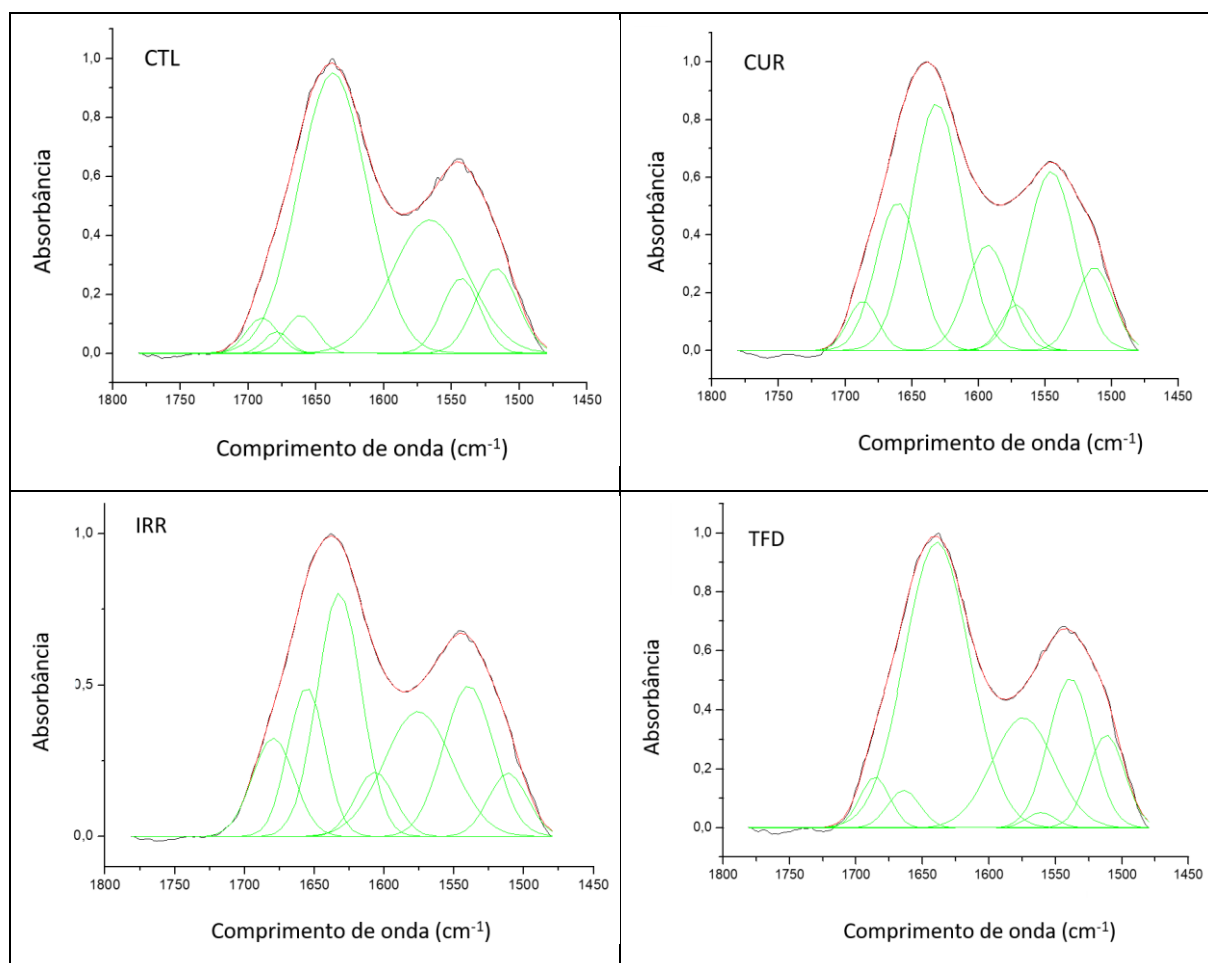
Figura 36: Espectro FT-IR de todos os tratamentos em regiões entre 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$ . (a) espectro original e (b) ajuste de curva.



Fonte: autor

A figura 37 mostra o espectro original e ajuste de curva da região entre 1800-1450  $\text{cm}^{-1}$  dos grupos CTL, CUR, IRR e TFD. Nesta região, encontram-se bandas de proteínas e suas deconvoluções, relacionadas com vibração de estiramento C=O. A absorção de amida II também encontrada nesta região, é devido à vibração de flexão N-H acoplado ao estiramento C-N vista em 1500-1560  $\text{cm}^{-1}$ .

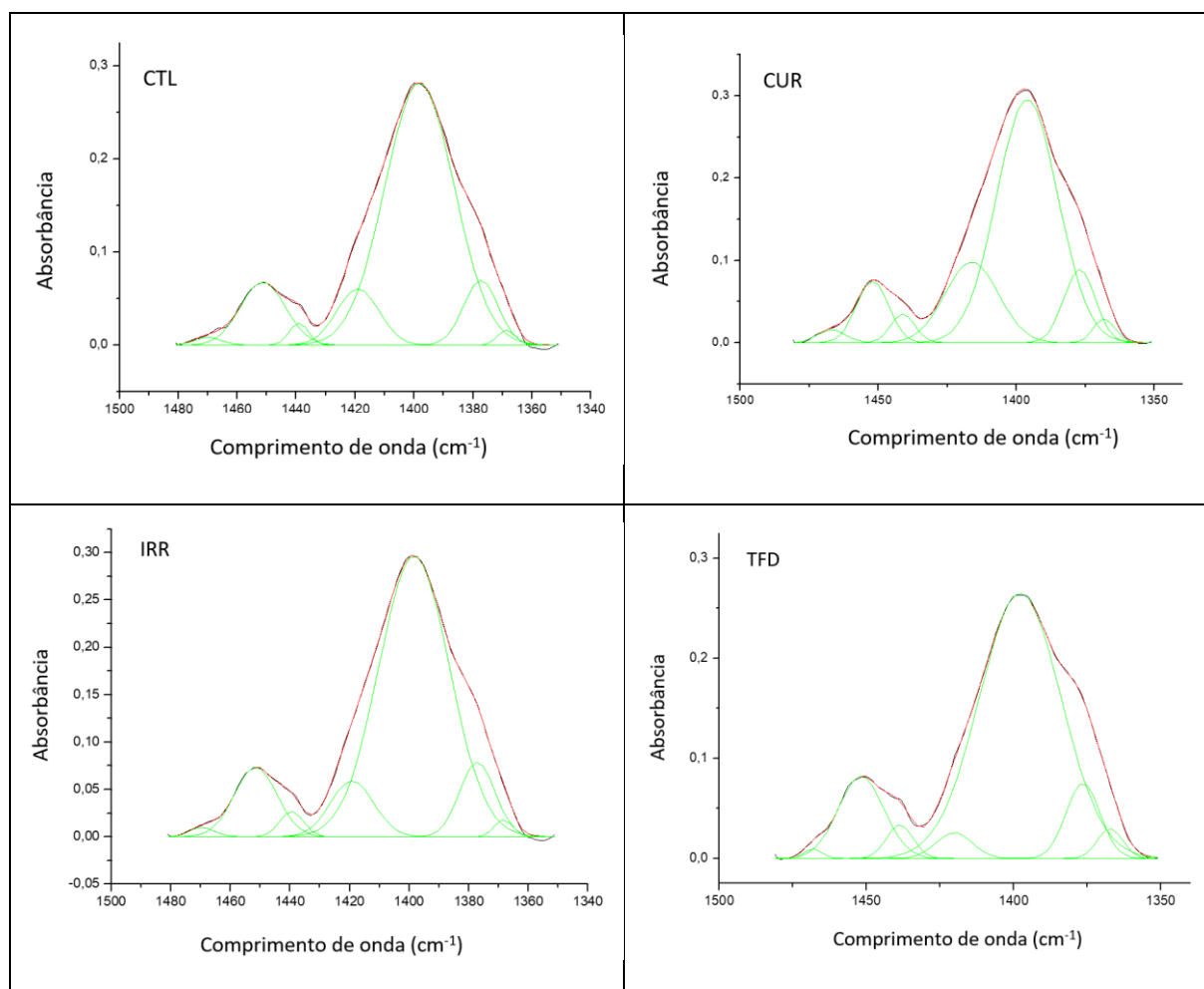
Figura 37: Espectro FT-IR de todos os tratamentos em regiões entre 1800-1450  $\text{cm}^{-1}$ : (a) espectro original e (b) ajuste de curva



Fonte: autor

A figura 38 mostra o espectro original e ajuste de curva da região entre 1500-1340  $\text{cm}^{-1}$  dos grupos CTL, CUR, IRR e TFD. Nesta região, encontram-se bandas de proteínas como amida III, com estiramento C-N e N-H no plano, bandas de lipídeos devido a deformação angular assimétrica de ligação C-H em  $-\text{CH}_2$ , além de estiramento simétrico de grupo carboxila ( $-\text{COOH}$ ) presente em lipídeos e aminoácidos.

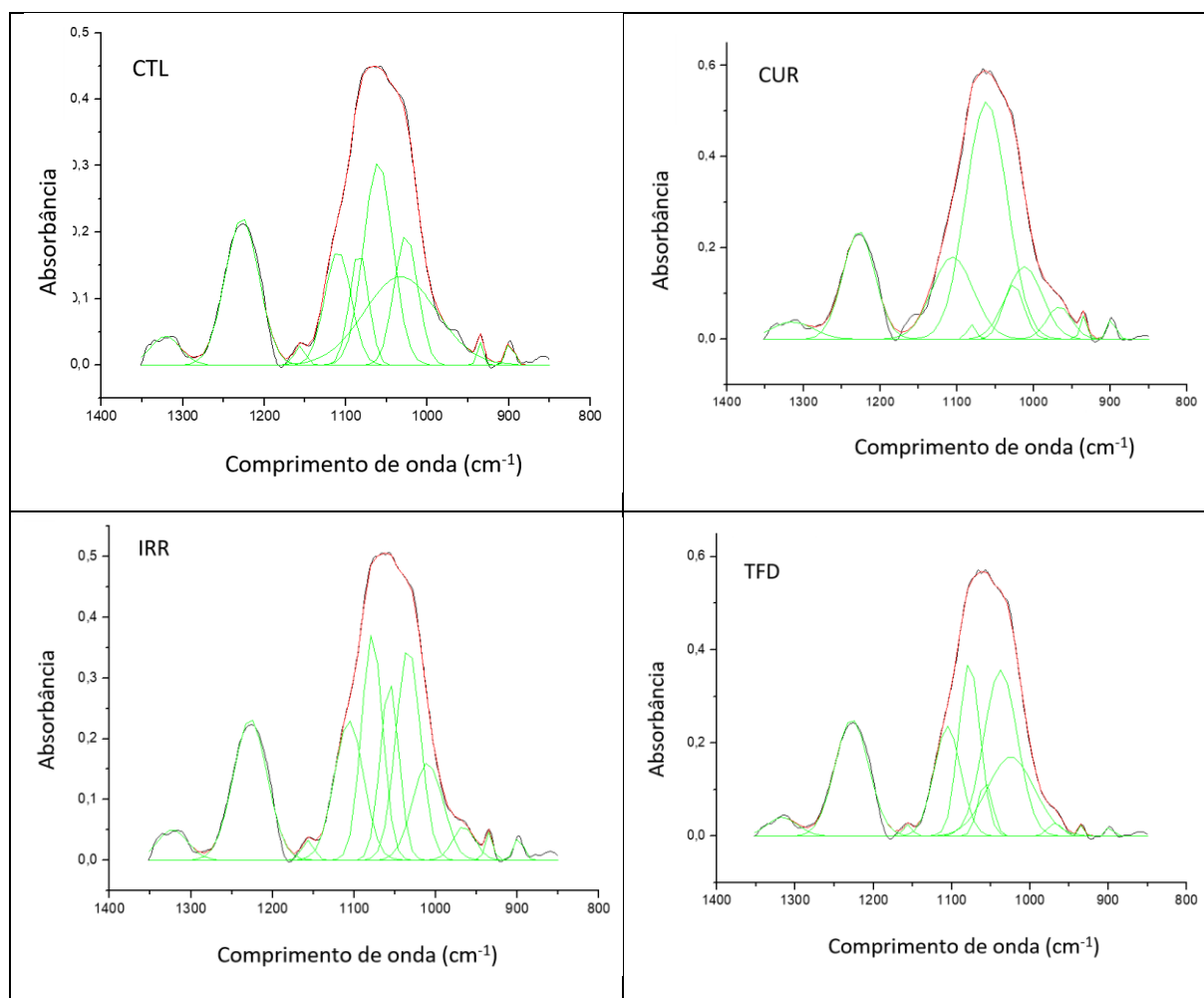
Figura 38: Espectro FT-IR de todos os tratamentos em regiões entre 1500-1340  $\text{cm}^{-1}$ : (a) espectro original, (b) ajuste de curva



Fonte: autor

A figura 39 mostra o espectro original e ajuste de curva da região entre 1400-800  $\text{cm}^{-1}$  dos grupos CTL, CUR, IRR e TFD. Nesta região, encontram-se bandas de absorção dos modos vibracionais dos grupos fosfatos. Os ácidos nucleicos são compostos por ligações fosfodiéster que possuem bandas de absorção infravermelha como vibrações de estiramento simétrico e assimétrico de  $\text{PO}_2$ , além de bandas de absorção de carboidratos atribuídas a vibrações de estiramento C-O.

Figura 39: Espectro FT-IR de todos os tratamentos em regiões entre 1400-800  $\text{cm}^{-1}$ : (a) espectro original, (b) ajuste de curva.



Fonte: autor

As tabelas 16, 18, 19, e 20 apresentam cálculo de área e atribuição de bandas de FT-IR de *A. baumannii*:  $\nu$  alongamento;  $\delta$  deformação, as assimétricas, s simétrica de lipídeos, proteínas, conformação secundária de proteínas, material nuclear e carboidratos.

A área sob as curvas referentes aos componentes biomoleculares, foram obtidos como resultado do ajuste de curva para cada número de onda. A área foi calculada, somando todas as áreas sob a curva para cada grupo.

A tabela 16 mostra o cálculo de área de lipídeo dos grupos CTL, IRR, CUR e TFD de *A. Baumannii*, e suas atribuições

Tabela 16 - Cálculo de área do componente biomolecular lipídico de grupos CTL, IRR, CUR e TFD e suas atribuições: u, alongamento;  $\delta$  deformação, s, simétrico; as, assimétrico.

Num.	Controle Pico	Controle Área	IRR Pico	IRR Área	CUR Pico	CUR Área	TFD Pico	TFD Área	Atribuição
1	2984,9	0,16434	2987,3	0,083508	2988,2	0,18500	2987,6	0,18321	$\nu_{as}$ (CH)(CH <sub>3</sub> )
2	2961,9	2,2859	2958,3	3,5371	2963,2	3,1957	2962,4	3,0109	$\nu_{as}$ (CH)(CH <sub>3</sub> )
3	2924,9	5,3743	2924,2	2,7152	2923,8	5,6319	2923,9	5,7274	$\nu_{as}$ (CH)(CH <sub>2</sub> )
4	2894,6	0,66719	2898,5	2,7214	2898,4	0,77023	2896,8	0,87605	$\nu_s$ (CH)(CH <sub>3</sub> )
5	2879,8	0,65569	2874,5	0,56173	2882,7	1,0332	2881,5	0,86472	$\nu_s$ (CH)(CH <sub>3</sub> )
6	2870,6	0,21454	2855,2	1,6048	2871,0	0,25317	2871,0	0,25212	$\nu_s$ (CH)(CH <sub>2</sub> )
7	2856,2	1,7303	2938,3	0,36494	2858,2	2,0677	2857,3	2,1581	$\nu_s$ (CH)(CH <sub>2</sub> )
8	1470,1	0,097671	1469,6	0,20336	1467,0	0,20326	1468,1	0,075474	$\delta_{as}$ (CH)(CH <sub>3</sub> ) e $\delta_{as}$ (CH)(CH <sub>2</sub> )
9	1451,4	1,2985	1451,5	1,3245	1452,1	1,0881	1451,8	1,6043	$\delta_{as}$ (CH)(CH <sub>2</sub> )
10	1321,5	2,0322	1322,4	2,2895	1314,4	2,5508	1316,0	1,9506	$\delta_s$ (CH)(CH <sub>3</sub> )
<b>Total</b>		14,520631		15,406038		16,97906		16,702874	

Fonte: autor

As tabelas 17 e 18 mostram o cálculo de área de proteínas e conformação secundária de proteínas dos grupos CTL, IRR, CUR e TFD e suas atribuições de *A. Baumannii*

Tabela 17 - Cálculo de área do componente biomolecular proteína de grupos CTL, IRR, CUR e TFD: u, alongamento;  $\delta$  deformação, s, simétrico; as, assimétrico.

Num.	Controle Pico	Controle Área	IRR Pico	IRR Área	CUR Pico	CUR Área	TFD Pico	TFD Área	Atribuição
1	1543,1	8,9164	1545,7	4,7655	1540,3	21,127	1538,6	24,805	amida II
2	1517,0	11,297	1521,0	15,029	1511,2	7,8954	1510,7	7,8195	amida II
3	1439,1	0,19574	1439,5	0,26557	1441,1	0,38724	1511,9	10,791	$\delta_{as}$ (CH)(CH <sub>3</sub> )
4	1419,1	1,0792	1419,1	1,0727	1416,2	2,3688	1438,6	0,37560	$\delta_s$ (CH)(CH <sub>3</sub> )
5	1398,2	8,3173	1398,3	8,8223	xxxxxx	xxxxxx	1420,3	0,39746	$\nu_s$ COO <sup>-</sup>
6	1377,4	1,0259	1377,1	1,1680	1377,1	1,2709	1376,5	1,0833	amida III
<b>Total</b>		30,83154		30,44223		36,46259		45,27186	

Fonte: autor

Tabela 18 - Cálculo de área de conformação secundária de proteínas dos grupos CTL, IRR, CUR e TFD.

Num.	Controle Pico	Controle Área	IRR Pico	IRR Área	CUR Pico	CUR Área	TFD Pico	TFD Área	Conformação secundária de proteína
1	1689,8	3,4859	1688,1	2,9141	1695,4	1,6479	1694,7	0,88961	amida I ( $\beta$ voltas)
2	1679,1	1,6881	1672,2	1,3320	1682,0	4,1487	1678,5	4,3989	amida I ( $\beta$ - folha)
3	1661,4	3,7290	1656,5	0,64292	1663,3	9,4991	1655,9	0,37679	Amida I ( $\alpha$ -hélice)
4	1637,6	59,879	1638,6	66,175	1637,8	44,932	1640,6	61,692	Amida I (desordenada)
<b>Total</b>		68,782		71,06402		60,2277		67,3573	
<b>Total</b>		99,61354		101,50625		96,69029		112,62916	

Fonte: autor

As tabelas 19 e 20 mostram o cálculo de área de material nuclear e carboidratos dos grupos CTL, IRR, CUR e TFD e suas atribuições de *A. Baumannii*

Tabela 19 - Cálculo de área de material nuclear dos grupos CTL, IRR, CUR e TFD e suas atribuições:  $\nu$ , alongamento;  $\delta$  de formação,  $s$ , simétrico;  $as$ , assimétrico.

Num.	Controle Pico	Controle Área	IRR Pico	IRR Área	CUR Pico	CUR Área	TFD Pico	TFD Área	Atribuição
1	1566,2	31,791	1563,4	32,212	1584,0	34,268	1574,2	22,846	$\delta_a$ NH <sub>2</sub> ou $\nu$ (C=N), C=N, NH <sub>2</sub> adenina
2	1368,6	0,12173	1368,3	0,098963	1368,3	0,28369	1367,3	0,32119	$\nu$ (C-N) citosina, guanina
3	1227,4	11,430	1231,8	9,7509	1228,0	12,447	1227,6	13,497	$\nu_{as}$ PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
4	1032,8	14,872	1083,6	7,7906	1080,8	0,45657	1077,1	12,624	$\nu_s$ PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
5	1026,1	7,0478	1062,9	4,5675	1061,4	34,651	1037,3	19,015	$\nu_s$ PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
6	1083,9	4,9020	1047,1	5,6155	1026,4	4,1011	1024,3	12,735	$\nu_{C-O}$ , desoxirribose
7	1060,2	13,799	1024,3	6,3850	1012,3	9,3380	1057,1	2,6777	$\nu_{C-O}$ , ribose
8	963,72	0,65471	990,99	0,96184	966,81	2,8915	967,85	0,64157	C-C, C-O ribose
9	934,8	0,32146	969,32	1,4417	934,75	0,58052	934,13	0,21111	C-C, C-O desoxirribose
10	898,37	0,43830	921,38	0,33858	898,35	0,59971	898,18	0,23822	DNA Helicoidal (Forma Z)
<b>Total</b>		85,378		59,394538		62,47981		85,80679	

Fonte: autor

Tabela 20 - Cálculo de área de carboidratos dos grupos CTL, IRR, CUR e TFD e sua atribuição: u, alongamento

<b>Num.</b>	<b>Controle Pico</b>	<b>Controle Área</b>	<b>IRR Pico</b>	<b>IRR Área</b>	<b>CUR Pico</b>	<b>CUR Área</b>	<b>TFD Pico</b>	<b>TFD Área</b>	<b>Atribuição</b>
<b>1</b>	1156,2	0,49485	1156,7	0,49685	1105,5	12,184	1156,7	0,37295	u (C-O) glicose, frutose
<b>2</b>	1109,6	6,8852	1111,5	8,8456	1148,6	0,11106	1105,5	10,184	u (C-O) dissacarídeos, sucrose
<b>Total</b>		7,38005		9,34245		12,29506		10,55695	

Fonte: autor.

A técnica de FT-IR é amplamente utilizada no estudo das propriedades de membrana bacteriana, composta por camadas lipídicas, onde as ligações químicas sofrem diferentes formas de vibrações, como estiramento, deformação e torção. A espectroscopia de infravermelho mede as vibrações e fornece informações sobre as estruturas moleculares e interações estruturais da membrana.

Ao comparar o grupo TFD com o grupo CTL, observa-se aumento de área de lipídeos em bandas 2987, 2962, 2923, 2896, 2881, 2871, 2857, 1451  $\text{cm}^{-1}$  cuja atribuições referem-se ao estiramento assimétrico e simétrico da ligação C-H em  $-\text{CH}_3$  e  $-\text{CH}_2$ , e deformação angular assimétrica em C-H em  $-\text{CH}_2$ . Observa-se que o grupo CUR e IRR produzem discreta variação de concentração de lipídios e o mesmo acontece com grupo TFD, porém, analisando sua área total observa-se aumento de 14,520631 para 16,702874. Em contrapartida, o cálculo de área total de lipídeos em *P. aeruginosa* foi maior, aumentando de 14,54307 em grupo CTL para 18,50398 em grupo TFD. Estes resultados mostram que a TFD atua em membrana bacteriana por conter maiores concentrações de lipídios e fosfolipídios.

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica útil para análise de proteínas, onde os dados espectrais de infravermelhos de polímeros são geralmente interpretados em termos de vibrações de uma unidade de repetição estrutural. As bandas amida I e II são as mais proeminentes da estrutura proteica, sendo a banda amida I, com região espectral mais sensível aos componentes estruturais secundários da proteína (KONG; YU, 2007).

Ao comparar o grupo TFD com o grupo CLT em proteínas, observam-se maiores aumentos de área nas bandas 1538 e 1511  $\text{cm}^{-1}$ , e diminuição de proteínas em algumas regiões. Quando analisados os grupos CUR e IRR isoladamente, observa-se variação de concentração de proteínas em algumas bandas.

Quando se analisa a área total do grupo TFD em comparação ao grupo CTL, observa-se aumento de área de 30,83154 do grupo CTL para 45,27186 em grupo TFD em *A. baumannii*. Comparando com *P. aeruginosa*, observa-se que a área total de proteína desta bactéria diminuiu discretamente de 33,3606 em grupo CTL para 32,96172 em grupo TFD.

Para estudo de estrutura secundária de proteínas, analisa-se a banda amida I, que se deve principalmente à vibração de estiramento C=O (aproximadamente 80%) dos

grupos amidas acopladas, com pouca flexão N-H no plano (20 %). A absorção associada à amida II leva principalmente a vibração de flexão da ligação NH. A frequência desta banda de vibração depende da natureza da ligação de hidrogênio envolvendo as porções C=O e NH, que por sua vez, é determinado pela estrutura secundária adotada pela cadeia polipeptídica, refletindo a conformação da “espinha dorsal” e o padrão de ligação de hidrogênio. Os contornos observados da banda amida I de proteínas, ou polipeptídios consistem em bandas de componentes sobrepostos, representado por  $\alpha$  –hélice,  $\beta$ - folha antiparalela,  $\beta$ - folha paralela, amida I (desordenada) e estrutura voltas que ocorrem na região de 1700 – 1600  $\text{cm}^{-1}$ . (KONG; YU, 2007; FORATO; BERNARDES FILHO; COLNAGO, 1998; STUART, 1997).

Ao comparar a área do grupo TFD com a grupo CTL, observa-se diminuição de estrutura  $\alpha$  –hélice de 3,7290 para 0,37679, respectivamente. Ao comparar com *P. aeruginosa*, observa-se que em *A. baumannii* a diminuição de área foi menor. Em *P. aeruginosa*, a variação foi de 33,187 em grupo CTL para 0,4833 em grupo TFD em estrutura  $\alpha$  –hélice demonstrando predominância desta estrutura.

O mesmo acontece quando se analisa o grupo IRR isoladamente. Observa-se que esta estrutura se altera em presença de luz e curcumina, sejam elas juntas ou separadas, porém o efeito de morte celular só acontece quando luz e fotossensibilizador atuam juntos em TFD, corroborando com os resultados de viabilidade bacteriana do experimento de contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL). A diferença de 2,28 logs entre CTL e TFD demonstra ação foto tóxica de TFD com curcumina em *A. baumannii*, bem como em *P. aeruginosa* onde o valor de 1,71 logs entre CTL e TFD reduziu a viabilidade bacteriana nos parâmetros testados (densidade energética de 30,6  $\text{J}/\text{cm}^2$ ).

A análise de contorno de banda amida I de *A. baumannii*, mostrou decomposição em quatro componentes, dentre eles, a estrutura voltas em 1689  $\text{cm}^{-1}$ , o que não aconteceu em *P. aeruginosa*. Comparando o grupo TFD com grupo CTL da estrutura voltas, observa-se diminuição desta área de 3,4859 em CTL para 0,88961 em TFD.

Um aumento de área total acontece em amida I desordenada e estrutura  $\beta$ - folha em *A. baumannii* bem como em *P. aeruginosa*, porém a estrutura amida I desordenada prevalece em *A. baumannii*.

A estrutura secundária  $\alpha$  –hélice mostra maior sensibilidade quando exposta a TFD, tanto em *P. aeruginosa* como em *A. baumannii*, com diminuição desta estrutura.

Isto sugere que a viabilidade bacteriana pode diminuir pela TFD, corroborando com os resultados obtidos em experimento de contagem de Unidades Formadora de Colônias (UFC/mL), onde os valores encontrados demonstram a ação foto tóxica de TFD *in vitro*. A TFD pode atuar em glicoproteínas de superfície bacteriana, além de mudanças conformacionais em proteínas celulares bacterianas relacionadas com modificação de expressão de moléculas, proteínas de membrana externa como fimbrias e flagelos, proteínas de agregação, enzimas entre outros. (BABINSKI, 2022). No entanto, estudo mais profundo do tema são necessários.

Em análises as áreas de material nuclear, observa-se maiores variações de área em bandas 1574,1037, 1024 e 1057  $\text{cm}^{-1}$  do grupo TFD. Observa-se variação em adenina, ribose e desoxirribose, no entanto, quando a área total do grupo TFD é analisada, nota-se discreta variação quando comparada a área total do grupo CTL que aumenta de 85,378 para 85,806 em grupo TFD, em contrapartida, em *P. aeruginosa*, esta variação é maior, aumentando de 52,60788 em grupo CTL para 65,95645 em grupo TFD. Observa-se que a TFD não resultou em alteração significativa nesta biomolécula em *A. baumannii*.

Em análises de área de carboidratos em grupo TFD de *A. baumannii*, nota-se discreta diminuição de área em banda 1156  $\text{cm}^{-1}$  em glicose e frutose e aumento de área em banda 1105  $\text{cm}^{-1}$  em dissacarídeos e sucrose. Porém, ao analisar a área total do grupo CTL com grupo TFD observa-se aumento de 7,38005 para 10,55695 respectivamente.

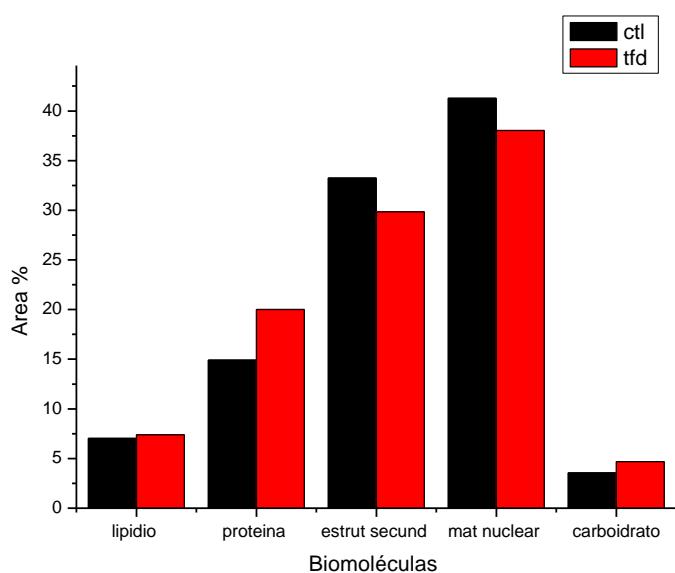
Quando se analisa área total do grupo TFD comparado ao grupo CTL em *P. aeruginosa*, observa-se diminuição de área em carboidratos de 10,5292 para 8,98671 respectivamente.

Ao comparar os diferentes constituintes biomoleculares presentes nestes dois micro-organismos, observa-se maior ou menor variação de área em diferentes bandas, porém os resultados sugerem que a ação do fotossensibilizador e luz em TFD resultam em maiores alterações de concentração de biomoléculas. Para análise discriminativa das características das bandas de TFD comparados com bandas de CTL, utilizou-se técnica de segunda derivada em *A. baumannii*.

A figura 40 abaixo mostra através do histograma a área em porcentagem das biomoléculas: lipídeos, proteínas, estrutura secundária de proteínas, material nuclear e carboidratos após TFD comparadas com CTL. Observa-se discreta variação de

lipídeos, diminuição de material nuclear, diminuição de estrutura secundária de proteínas, aumento de proteínas, e aumento de carboidratos.

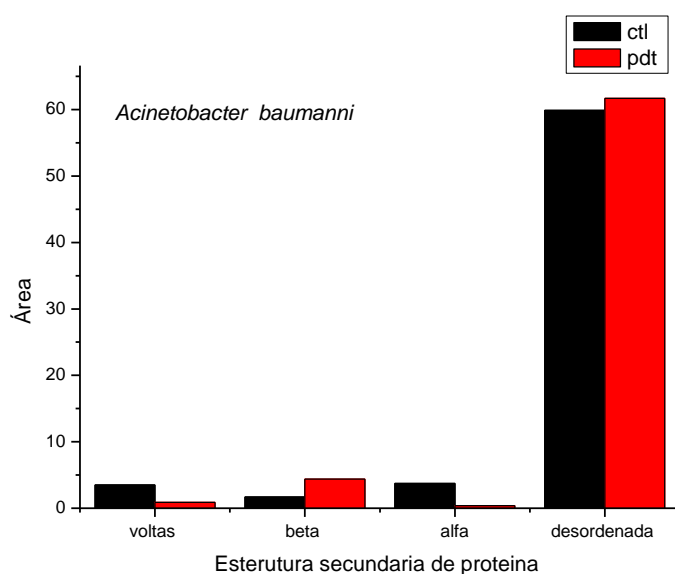
Figura 40: Comparação de área (%) de biomoléculas do grupo CTL e grupo TFD em *A. baumannii*.



Fonte: autor

A figura 41 mostra através do histograma a área de estrutura secundária de proteína como estrutura voltas,  $\beta$  folha,  $\alpha$  –hélice e amida I desordenada. A área em vermelho corresponde ao grupo TFD comparado ao grupo CTL em preto. Observa-se predominância de amida I desordenada, e o aparecimento de estrutura voltas. Nota-se diminuição de  $\alpha$  –hélice e voltas e aumento de  $\beta$ - folha e amida I desordenada.

Figura 41: Comparação de área de biomoléculas de estrutura secundária de proteínas após TFD em *A. baumannii*



Fonte: autor

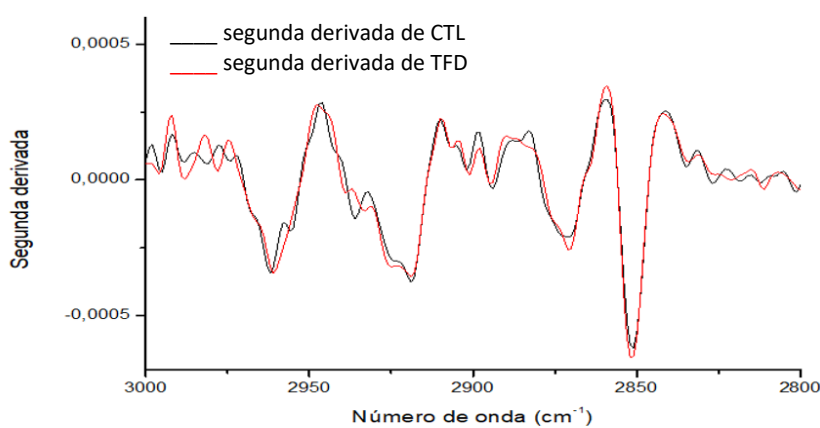
Com o intuito de analisar as pequenas alterações nos contornos de bandas, deslocamentos sutis, aparecimento, desaparecimento de bandas e intensidades dos mesmos, recorre-se a técnica de segunda derivada, comparando as regiões de TFD e CTL das diferentes biomoléculas

### 5.10 Espectro de Segunda derivada de *Acinetobacter baumannii*

Os espectros de segunda derivada de *A. baumannii* foram observados, comparando-se os espectros do grupo CTL com os espectros do grupo TFD visualizado através da figura 42. Foram comparados os espectros de CTL e TFD na

região de 3000 a 2800  $\text{cm}^{-1}$ . Observam-se espectros com contornos e intensidades diferentes, notam-se deslocamento, aumento de intensidade e largura de bandas. Quando se compara a segunda derivada dos espectros de TFD de *A. baumannii* com os de *P. aeruginosa*, observa-se o aumento do grau de visualização dos picos individuais.

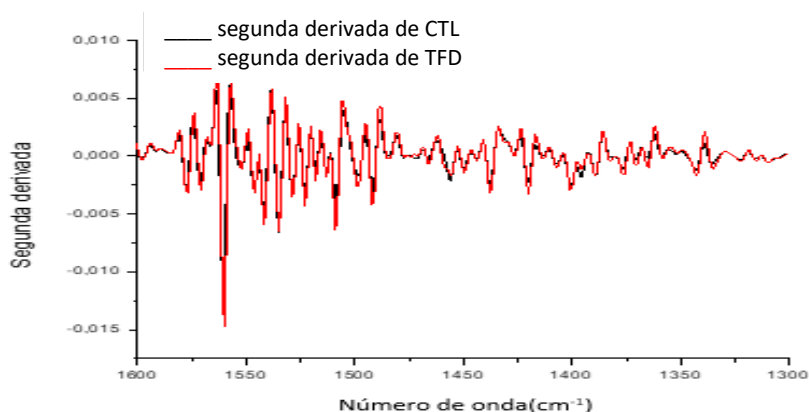
Figura 42: Espectro de segunda derivada dos grupos CTL e TFD na região 3000 a 2800  $\text{cm}^{-1}$  em *A.baumannii*.



Fonte: autor

A figura 43 mostra os picos em região de 1600 a 1300  $\text{cm}^{-1}$ . As principais bandas nesta região, sugerem presença de material nuclear, lipídeos e proteínas. Nota-se o aumento de intensidade e definição das bandas após o tratamento com TFD.

Figura 43: Espectro de segunda derivada dos grupos CTL e TFD da região de 1600 a 1300  $\text{cm}^{-1}$  em *A.baumannii*.

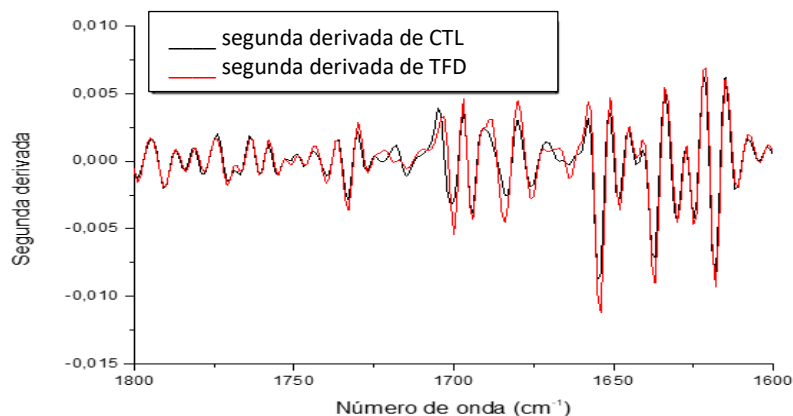


Fonte: autor

A figura 44 mostra o espectro de segunda derivada na região de 1800 a 1600  $\text{cm}^{-1}$ . As principais bandas nesta região, sugerem presença de proteínas e fosfolipídios.

Observa-se a diferença de contornos de bandas de CTL e TFD nesta região, além de aumento, desaparecimento e deslocamento de bandas do grupo TFD.

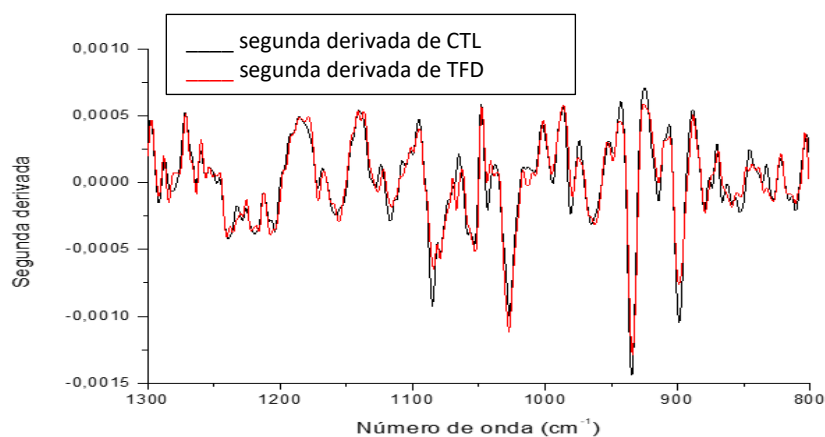
Figura 44: Espectro de segunda derivada dos grupos CTL e TFD da região de 1800 a 1600  $\text{cm}^{-1}$  em *A. baumannii*.



Fonte: autor

A figura 45 mostra o espectro de segunda derivada na região de 1300 a 800  $\text{cm}^{-1}$ . Observa-se a diferença de contornos de bandas de CTL e TFD nesta região. As principais bandas sugerem presença de material nuclear. Observa-se aumento e diminuição do contorno de bandas em algumas regiões, além de deslocamento e aparecimento de bandas.

Figura 45: Espectro de segunda derivada dos grupos CTL e TFD da região de 1300 a 800  $\text{cm}^{-1}$  em *A. baumannii*.



Fonte: autor

## 6 CONCLUSÃO

Através da Espectroscopia Vibracional do Infravermelho, os espectros dos grupos CTL, IRR, CUR e TFD de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* foram analisados por inspeção visual direta, apresentando-se visualmente idênticos devido as posições muito próximas do número de ondas dos componentes biomoleculares de ambas as cepas. No entanto, a Análise Estatística Multivariada discriminou os espectros de todos os grupos e das cepas utilizadas no estudo.

Através dos dendrogramas, observou-se diferenças de associação entre os espectros de cada grupo quando submetidos às mesmas condições de análises e protocolo, demonstrando a complexidade dos micro-organismos.

Os espectros de segunda derivada de TFD dos micro-organismos mostraram diferenças nos contornos de bandas devido ao aumento do grau de visualização dos picos, além de deslocamento, aumento e diminuição das bandas.

Os resultados obtidos com o método de ajuste de curva para *P. aeruginosa* e *A. baumannii* foram importantes para análise de bandas decompostas, demonstrando que a TFD com curcumina altera concentrações de lipídeos, proteínas, conformação secundária de proteínas, material nuclear e carboidrato.

Das biomoléculas analisadas, a proteína apresentou maior predominância nos dois micro-organismos, no entanto, em *P. aeruginosa*, a estrutura  $\alpha$  hélice diminuiu significativamente. Em *A. baumannii*, esta estrutura também diminuiu e a estrutura amida I desordenada aumentou. A estrutura voltas aparece em *A. baumannii* por deconvolução da banda amida I, apresentando diminuição de área. A estrutura  $\beta$  folha aumentou nos dois micro-organismos.

Com estes resultados, observou-se um padrão de morte celular pela TFD, onde os espectros mostraram sua ação predominante em proteínas. Os resultados obtidos no estudo de contagem de Unidades Formadora de Colônias (UFC/mL) demonstraram a ação foto tóxica de TFD *in vitro* resultando em diminuição de viabilidade bacteriana. A eficácia da TFD ocorreu quando o fotossensibilizador e a luz utilizados concomitantemente resultou em morte celular bacteriana. Estes resultados ressaltam a importância da curcumina utilizada como fotossensibilizador em TFD em cepas multirresistentes.

A espectroscopia FT-IR foi aplicada com sucesso na identificação do padrão de morte bacteriana pelo efeito da TFD, permitindo interpretar quantitativamente as mudanças bioquímicas do conteúdo bacteriano. Além disso, as cepas foram discriminadas de forma precisa, rápida e sem geração de resíduos tóxicos.

Para trabalhos futuros, a pesquisa deve continuar de modo a ampliar o banco de dados em uma gama maior de espécies microbianas, a fim de utilizá-lo na prática em diferenciação e identificação de bactérias, gerando rápido diagnóstico de modo a auxiliar a conduta terapêutica antimicrobiana medicamentosa.

## REFERÊNCIAS

ABDELKARIM-ELAFIFI, Haitham; PARADA-AVENDAÑO, Isabel; ARNABAT-DOMINGUEZ, Josep. Photodynamic Therapy in Endodontics: A Helpful Tool to Combat Antibiotic Resistance? A Literature Review. **Antibiotics**, v. 10, n. 9, p. 1106, 2021. doi:10.3390/antibiotics10091106

ABRAHAMSE, Heidi; HAMBLIN, Michael R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347-364, 2016. <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>

AGUIAR, J. C. *et al.* Using FT-IR spectroscopy for the identification of the *T. cruzi*, *T. rangeli*, and the *L. chagasi* species. **Experimental parasitology**, v. 192, p. 46-51, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.07.008>

AL-BISHRI, Widad M. Hepato therapeutic efficacy of native curcumim and nano-curcumin: a novel therapy against hyperthyroidism induced liver oxidative and inflammatory damage in rats. **Int J Adv Res**, v. 4, n. 12, p. 86-97, 2017. <https://www.researchgate.net/publication/322271681>

AL-QADIRI, Hamzah M. *et al.* Rapid detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* as pure and mixed cultures in bottled drinking water using Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 16, p. 5749-5754, 2006. <https://doi.org/10.1021/jf0609734>

BABINSKI, Tatiane Patricia *et al.* Uso da curcumina na terapia fotodinâmica antimicrobiana: uma revisão use of curcumin in antimicrobial photodynamic therapy: a review. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 2, p. 7259-7271, 2022. DOI:10.34119/bjhrv5n2-286

**BANHARA, Vanessa** Fernandez *et al.* **Análise das alterações biomoleculares causadas pelo fármaco diclofenaco sódico em peixes da espécie *Brycon opalinus* através da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**. 2016.78 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2016.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. 1º reimpressão. Viçosa, MG: UFV, 2011.

BARTH, Andreas. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v.1767, n.9, p.1073-1101, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>

BASSI, Adalberto BMS. Conceitos fundamentais em espectroscopia. **Revista Chemkeys**, n. 9, p. 1-14, 2001.

BEECH, Iwona *et al.* Chemical and structural characterization of exopolymers produced by *Pseudomonas* sp. NCIMB 2021 in continuous culture. **Microbiology**, v. 145, n. 6, p. 1491-1497, 1999. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-6-1491>

BELLI, L. P. A. **Desenvolvimento de fotossensibilizador metaloporfirínico para potencial terapia fotodinâmica**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020. <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/218573>

BIOPDI. Equipamento de irradiação – *IrradLed* 48. 2021. Disponível em: <https://biopdi.com.br/optica/irradiacao/48-leds/#galeria> Acesso em: out. 2021.

BOMBALSKA, Aneta *et al.* Application of FTIR and SERS spectroscopy in analysis and discrimination of bacteria and their interferents. **Biomedical Spectroscopy and Imaging**, v. 3, n. 1, p. 29-39, 2014. <https://doi.org/10.3233/BSI-130060>

BOUCHER, Helen W. *et al.* Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 48, n. 1, p. 1-12, 2009. <https://doi.org/10.1086/599017>

BUNACIU, Andrei A.; ABOUL-ENEIN, Hassan Y.; FLESCHEIN, Șerban. Vibrational spectroscopy in clinical analysis. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 50, n. 2, p. 176-191, 2015. <https://doi.org/10.1080/05704928.2014.955582>

CALLAO, M. P., RUISANCHEZ, I. An overview of multivariate qualitative methods for food fraud detection. **Food Control**, v. 86, p. 283-293, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.034>

CANTOR, Charles R.; SCHIMMEL, Paul R. **Biophysical chemistry: Part II: Techniques for the study of biological structure and function**. [S.l.]: Macmillan, 1980.

CARVALHO, Denise Pereira de Lima *et al.* Study of photodynamic therapy in the control of isolated microorganisms from infected wounds—an in vitro study. **Lasers in medical science**, v. 29, n. 1, p. 113-120, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1283-8>

CAVALCANTI, Thiago Maciel. **Avaliação do efeito antibacteriano da terapia fotodinâmica a laser: estudo *in vitro***. 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2011.

CELIEŠIŪTĒ-GERMANIENĒ, Raimonda *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) for biofilm treatments. Possible synergy between aPDT and pulsed electric fields. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 2247, 2021. doi:10.1080/21505594.2021.1960105

CORREIA, Thâmara Tallita da Silva Correa. **Inativação Fotodinâmica antimicrobiana *in vitro* de *Cândida Albicans* e *Staphylococcus aureus* assistida por nanocascas de ouro**. 2018. 82f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

DAVIS, R.; MAUER, L.J. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: A rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. *In*: MÉNDEZ-VILAS, A. (ed). **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**. Badajoz, Spain: Formatex, 2010. p. 1582-1594. (Microbiology Series Nº 2).

DE SOUSA, Telma *et al.* Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12892, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms222312892>

DEIDDA, Francesca *et al.* Bifidobacteria strain typing by fourier transform infrared spectroscopy. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 692975, 2021 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.692975>

DELECAVE, B. **A Ciência das Cores**. [Rio de Janeiro]: Fundação Osvaldo Cruz, 2011. Cap. 1 p. 1-2. Disponível em: <http://www.invivo.fiocruz.br/cienciaetecnologia/a-ciencia-das-cores/>

DENISSEN, Julia *et al.* Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection, and risk to human health. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 244, p. 114006, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.114006>

DIAS, Luana Mendonça *et al.* Use of Photodynamic Therapy Associated with Antimicrobial Peptides for Bacterial Control: A Systematic Review and Meta-Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 6, p. 3226, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23063226>

DZIUBA, Bartłomiej *et al.* Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis. **International dairy journal**, v. 17, n. 3, p. 183-189, 2007. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2006.02.013>

FAGUNDES, Jaciara *et al.* Evaluation of photodynamic therapy with methylene blue, by the Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) in *Leishmania major*-in vitro. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 207, p. 229-235, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.09.031>

FINLAYSON, Duncan; RINALDI, Christopher; BAKER, Matthew J. Is infrared spectroscopy ready for the clinic? **Analytical chemistry**, v.91, n. 19, p. 12117-12128, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02280>.

FORATO, Lucimara A.; BERNARDES FILHO, Rubens; COLNAGO, Luiz A. Estudo de métodos de aumento de resolução de espectros de FTIR para análise de estruturas secundárias de proteínas. **Química Nova**, v. 21, p. 146-150, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000200008>

FREITAS, L. M. **Combinação da terapia fotodinâmica a peptídeos antimicrobianos: efeitos e mecanismos**. 2018. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2018. <http://hdl.handle.net/11449/155990>.

FREITAS, Mirian A. A. *et al.* Bacterial viability after antimicrobial photodynamic therapy with curcumin on multiresistant *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 739-748, 2019. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0042>

GEDEFIE, Alemu *et al.* *Acinetobacter baumannii* biofilm formation and its role in disease pathogenesis: a review. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 3711, 2021. <https://doi.org/10.2147/IDR.S332051>

GRINHOLC, Mariusz *et al.* Fine-tuning *recA* expression in *Staphylococcus aureus* for antimicrobial photoinactivation: importance of photo-induced DNA damage in the photoinactivation mechanism. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 21, p. 9161-9176, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6863-z>

GURGEL, Carla Vecchione. **Ação da clorofila como fotossensibilizador e do LED como fonte de luz alternativa na terapia fotodinâmica antimicrobiana contra o *Enterococcus faecalis***. 2013. 125 f. Tese (doutorado) Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2013.

HAMBLIN, Michael R.; HASAN, Tayyaba. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436-450, 2004. <https://doi.org/10.1039/B311900A>

HARDING, Christian M.; HENNON, Seth W.; FELDMAN, Mario F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 91-102, 2018. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.148>

HARRISON, Jesse P.; BERRY, David. Vibrational spectroscopy for imaging single microbial cells in complex biological samples. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 675, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00675>

HORI, Leda Yumi. **Susceptibilidade do *Staphylococcus aureus* à terapia fotodinâmica (PDT)**. 2013. 61 f Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia-Bioquímica) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2013.

HOWARD, Aoife *et al.* *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. **Virulence**, v. 3, n. 3, p. 243-250, 2012. <https://doi.org/10.4161/viru.19700>

JAIN, Anil K.; MURTY, M. Narasimha; FLYNN, Patrick J. Data clustering: a review. **ACM computing surveys (CSUR)**, v. 31, n. 3, p. 264-323, 1999. <https://doi.org/10.1145/331499.331504>

KEMSLEY, E. K. Discriminant analysis of high-dimensional data: a comparison of principal components analysis and partial least squares data reduction methods. **Journal of Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 33, p. 47-61, 1996. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(95\)00090-9](https://doi.org/10.1016/0169-7439(95)00090-9)

KLAISS-LUNA, Maria C.; MANRIQUE-MORENO, Marcela. Infrared Spectroscopic Study of Multi-Component Lipid Systems: A Closer Approximation to Biological Membrane Fluidity. **Membranes**, v. 12, n. 5, p. 534, 2022. <https://doi.org/10.3390/membranes12050534>

KONG, Jilie; YU, Shaoning. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 39, n. 8, p. 549-559, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x>

KUBRAK, Tomasz Piotr *et al.* Some Natural Photosensitizers and Their Medicinal Properties for Use in Photodynamic Therapy. **Molecules**, v. 27, n. 4, p. 1192, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27041192>

KUMAR, Komal; PRASAD, A. D. Fourier transform infrared spectroscopy an advanced technique for identification of biomolecules. **spectroscopy**, v. 14, p. 15, 2012.

LEE, Chang-Ro *et al.* Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 55, 2017. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00055>

LEE, Jiyoung *et al.* Rapid tool for identification of bacterial strains using Fourier transform infrared spectroscopy on genomic DNA. **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 3, p. 864-871, 2019. <https://doi.org/10.1111/jam.14171>

LEITE, D. P. V. *et al.* Desinfecção bucal com terapia fotodinâmica. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB, 24., 2014, Uberlândia. **Anais Eletrônico [...]**. Rio de Janeiro: SBEB, 2014. Disponível em: [https://www.canal6.com.br/cbeb/2014/artigos/cbeb2014\\_submission\\_248.pdf](https://www.canal6.com.br/cbeb/2014/artigos/cbeb2014_submission_248.pdf) Acesso em: Dez. 2022.

LEITE, Diego de Oliveira; PRADO, Rogério Junqueira. Espectroscopia no infravermelho: uma apresentação para o Ensino Médio. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 34, 2012. <https://doi.org/10.1590/s1806-11172012000200015>

LONGO, Francesca; VUOTTO, Claudia; DONELLI, Gianfranco. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. **New Microbiol**, v. 37, n. 2, p. 119-127, 2014.

MACHADO, Antonio Eduardo da Hora. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, p. 237-243, 2000. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422000000200015>

MAITY, Jyoti Prakash *et al.* Identification and discrimination of bacteria using Fourier transform infrared spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 116, p. 478-484, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.07.062>

MANCUSO, Giuseppe *et al.* Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. **Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1310, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101310>

MARIN, Eder Prodossimo. **Espectroscopia de infravermelho e suas aplicações**. 2013. 73 f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, 2013. Available at: <<http://hdl.handle.net/11449/119826>>.

MARINI, Monica *et al.* DNA Studies: Latest Spectroscopic and Structural Approaches. **Micromachines**, v. 12, n. 9, p. 1094, 2021. <https://doi.org/10.3390/M12091094>

MOITA-NETO, J. M. Estatística multivariada: uma visão didática-metodológica. **Revista crítica na rede-Filosofia da ciência**, maio 2004. Disponível em: [https://143.54.226.61/~viali/cursos/ceea/multi/textos/Moita\\_Neto.pdf](https://143.54.226.61/~viali/cursos/ceea/multi/textos/Moita_Neto.pdf)

MULANI, Mansura S. et al. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 539, 2019. doi:10.3389/fmicb.2019.00539

NANDIYANTO, Asep Bayu Dani; OKTIANI, Rosi; RAGADHITA, Risti. How to read and interpret FTIR spectroscopy of organic material. **Indonesian Journal of Science and Technology**, v. 4, n. 1, p. 97-118, 2019. <https://doi.org/10.17509/ijost.v4i1.15806>

NICULESCU, Adelina-Gabriela; GRUMEZESCU, Alexandru Mihai. Photodynamic therapy—an up-to-date review. **Applied Sciences**, v. 11, n. 8, p. 3626, 2021. <https://doi.org/10.3390/app11083626>

NOOR, Hazrat et al. Insight on esterase from *Pseudomonas aeruginosa* strain S3 that depolymerize poly (lactic acid) (PLA) at ambient temperature. **Polymer Degradation and Stability**, v. 174, p. 109096, 2020. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMDEGRADSTA.BAUMANNII.2020.109096>

NOWAK, Pawel; PALUCHOWSKA, Paulina. *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance—role of carbapenemases. **Folia histochemica et cytobiologica**, v. 54, n. 2, p. 61-74, 2016. DOI: 10.5603/FHC.a2016.0009

NUNES, Willian de Carvalho. Utilização da Espectroscopia Vibracional no Infravermelho (FTIR-UATR) no controle de qualidade de medicamentos contendo cloridrato de Clorazepato. 2018. 58 f. Dissertação ( Mestrado em Bioengenharia) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2018.

PANG, Zheng *et al.* Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology advances**, v. 37, n. 1, p. 177-192, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>

PIRES, Sílvia; PARKER, Dane. Innate immune responses to *Acinetobacter baumannii* in the airway. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 39, n. 8, p. 441-449, 2019. <https://doi.org/10.1089/jir.2019.0008>

POLAT, Ece; KANG, Kyungsu. Natural photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy. **Biomedicines**, v. 9, n. 6, p. 584, 2021. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9060584>

POURHAJIBAGHER, Maryam *et al.* Evaluation of photodynamic therapy effect along with colistin on pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Laser Therapy**, v. 26, n. 2, p. 97-103, 2017. <https://doi.org/10.5978/islsm.17-OR-7>

RIBEIRO, Isabelle de Paula. **Avaliação da Curcumina na Terapia Fotodinâmica sobre biofilme de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina— estudo *in vitro***. 2021. 67 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2021.

ROGGO, Y. *et al.* A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical Technologies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 683–700, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.03.023>

SAKANE, Kumiko K. *et al.* Biochemical changes in *Leishmania braziliensis* after photodynamic therapy with methylene blue assessed by the Fourier transform infrared spectroscopy. **Lasers in Medical Science**, v. 36, n. 4, p. 821-827, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10103-020-03110-2>

SAKANE, Kumiko K. *et al.* Espectros infravermelhos da creatina. **Revista Univap**, v. 17, n. 29, p. 145-156, 2011.

SANTAJIT, Sirijan; INDRAWATTANA, Nitaya. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **BioMed research international**, v. 2016, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>

SANTEZI, Carolina; REINA, Bárbara Donadon; DOVIGO, Livia Nordi. Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections—A review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 409-415, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.01.016>

SANTOS, Susana Cláudia Conceição. **Síntese, caracterização espectroscópica de novos corantes esquadricos assimétricos e avaliação do seu potencial na Terapia Fotodinâmica, usando as linhas celulares MCF-7 e BT-474.** 2015. 143 F. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 2015.

SANTOS, Patrícia Marcondes dos. **Diferenciação de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida parapsilosis* através da microespectroscopia (FT-IR) e análise estatística multivariada.** 2011. 72 F. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2011.

SANTOS, Thiago Vieira Soares dos. **Terapia fotodinâmica: uma revisão dos conceitos gerais e dos avanços de novos sistemas carreadores desenvolvidos com base na nanotecnologia.** 2020. 59 f. Trabalho de conclusão de curso (Química), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

SELLERA, Fábio Parra; GARGANO, Ronaldo Gomes; POGLIANI, Fabio Celidonio. Terapia fotodinâmica: revisão de literatura. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 12, n. 1, p. 5-13, 2014. <https://doi.org/10.36440/recmvz.v12i1.23097>

SILVA, Zenildo Santos *et al.* Animal models for photodynamic therapy (PDT). **Bioscience reports**, v. 35, n. 6, 2015. <https://doi.org/10.1042/BSR20150188>

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X.; KIEMLE D. J. **Aplicação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos.** 7<sup>o</sup> ed. 2006. p. 70-85.

SIMPLICIO, Fernanda Ibanez; MAIONCHI, Florângela; HIOKA, Noboru. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, p. 801-807, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000500016>

SINGH, Bhawana *et al.* Application of vibrational microspectroscopy to biology and medicine. **Special section: Chemistry and biology; Current Science**, v 102, p.232-244, 2012.

SINGH, S. K. Multivariate Analysis: An Overview. **Journal of dentofacial sciences**, v. 2 p 19-25. 2013.

SOUZA, André Marcelo de; POPPI, Ronei Jesus. Teaching experiment of chemometrics for exploratory analysis of edible vegetable oils by mid infrared spectroscopy and principal component analysis: a tutorial, part I. **Química Nova**, v. 35, p. 223-229, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000100039>

SPERANDIO, Felipe F.; HUANG, Ying-Ying; HAMBLIN, Michael R. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 8, n. 2, p. 108-120, 2013. <https://doi.org/10.2174/1574891x113089990012>

STUART, B. **Biological Applications of infrared Spectroscopy**. Baffins Lane: John Wiley & Sons, 1997

SUETH-SANTIAGO, Vitor *et al.* Curcumina, o pó dourado do açafreão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, v. 38, p. 538-552, 2015. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150035>

SULTAN, Maria; ARYA, Rekha; KIM, Kyeong Kyu. Roles of two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, p. 12152, 2021. doi:10.3390/ijms222212152

TAMM, Lukas K.; TATULIAN, Suren A. Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. **Quarterly reviews of biophysics**, v. 30, n. 4, p. 365-429, 1997. <https://doi.org/10.1017/S0033583597003375>

TAREB, R. *et al.* Usefulness of FTIR spectroscopy to distinguish rough and smooth variants of *Lactobacillus farciminis* CNCM-I-3699. **Microbiology Letters**, v. 364, n. 2, p. fnw298, 2017. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw298>

THI, Minh Tam Tran; WIBOWO, David; REHM, Bernd HA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 22, p. 8671, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>

TOMÉ, João Paulo Costa. **Síntese e avaliação biológica De Porfirinas anfifílicas**. 2001. 204f. Tese (Doutorado) Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal, 2001.

TWARDOWSKI, Jacek; ANZENBACHER, Pavel; MASSON, Mary R. **Raman and IR spectroscopy in biology and biochemistry**. New York: Ellis Horwood, 1994. p.20-22.

VASCONCELOS, S. **Análise de componentes principais**. [Niteroi: Universidade Federal Fluminense, 2020]. Disponível em: <http://www2.ic.uff.br/~aconci/PCA-ACP.pdf>. Acesso: out. 2020.

WORKMAN, J. J.; BURNS, D.; CIURCZAK, E. NIR spectroscopy calibration basics. **Practical Spectroscopy Series**, v. 27, p. 91-128, 2001.

WU, W.; MASSART, D. L.; DE JONG, S. The kernel PCA algorithms for wide data. Part I: Theory and algorithms. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 36, n. 2, p. 165–172, 1997.

WU, Weihui *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*. In: TANG, Yi-Wei (ed.) *et al.* **Molecular medical microbiology**. 2. ed. New York: Elsevier, 2015. v. 2, p. 753-767. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00041-X>

XU, Jun-Li *et al.* Characterisation and Classification of Foodborne Bacteria Using Reflectance FTIR Microscopic Imaging. **Molecules**, v. 26, n. 20, p. 6318, 2021. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26206318>

YANG, Cheng-Hong *et al.* Biofilm formation in *Acinetobacter Baumannii*: genotype-phenotype correlation. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1849, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24101849>

ZHAO, Zhan-Juan *et al.* Photodynamic antimicrobial chemotherapy in mice with *Pseudomonas aeruginosa*-infected wounds. **Plos one**, v. 15, n. 9, p. e0237851, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237851>