

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

THAILA QUATRINI CORRÊA

Técnicas ópticas para o controle microbiológico de sangue

São Carlos - SP

2017

THAILA QUATRINI CORRÊA

Técnicas ópticas para o controle microbiológico de sangue

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadores:

Prof^a. Dr^a. Cristina Kurachi

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

São Carlos - SP

2017

Corrêa, Thaila Quatrini

Técnicas ópticas para o controle microbiológico de sangue / Thaila Quatrini Corrêa. -- 2017.
119 f. : 30 cm.

Tese (doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Banca examinadora: Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato, Profa. Dra. Elenice Deffune, Profa. Dra. Livia Nordi Dovigo, Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal, Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

Bibliografia

1. Inativação fotodinâmica. 2. Radiação ultravioleta. 3. Sangue. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Thaila Quatrini Corrêa, realizada em 09/11/2017:

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato
USP

Profa. Dra. Elenice Deffune
UNESP

Profa. Dra. Livia Nordi Dovigo
UNESP

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza
UFSCar

Aos meus pais, Dorival e Maria, meus
exemplos de vida e perseverança.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir em frente.

Ao meu pai Dorival e minha mãe Maria, por todo amor, cuidado e carinho dedicados a mim, pelo incentivo e apoio constantes, pela educação que me deram e por serem os meus melhores exemplos de vida! Vocês são tudo pra mim.

À minha irmã Thaline, minha alma gêmea, que sempre participou com muito carinho e amor de todas as etapas da minha vida, agradeço por estar ao meu lado, por compartilhar mais essa conquista e por ser tão especial.

Ao meu marido Rogerio, que sempre esteve comigo nos momentos mais importantes da minha vida, agradeço pelo incentivo, paciência, compreensão durante todos os anos de estudo e por não me deixar desistir. Obrigada por tornar meus dias mais felizes.

Ao Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato, pela orientação e oportunidade em trabalhar em seu grupo de pesquisa. Obrigada pelo apoio científico e incentivo ao crescimento profissional.

À Prof^ª. Dr^ª. Cristina Kurachi, pela orientação, discussões e sugestões muito importantes para o desenvolvimento desta pesquisa. Obrigada por contribuir em minha formação científica.

À Natalia Inada, pela co-orientação e acompanhamento durante o doutorado. Obrigada pelo suporte científico, pelas discussões enriquecedoras e por todas as oportunidades.

À Kate Blanco, por ajudar prontamente em cada experimento e participar com carinho de cada etapa. Obrigada por tudo, principalmente pelas conversas e reflexões sobre a vida.

Ao Sebastião Pratavieira, por toda ajuda na realização de vários experimentos, principalmente nos da microscopia confocal. Obrigada por tudo, pelas discussões, sugestões e reflexões.

Ao José Dirceu, pelo incentivo e conversas durante o doutorado, importantes para mostrar que sempre vale a pena continuar, por mais que estejamos cansados. Obrigada por todo suporte.

À Prof^ª. Dr^ª. Elenice Deffune, Dr^ª. Marjorie Golim, Ana Livia Bovolato e Laís de Santis, pela colaboração na realização dos experimentos de citometria de fluxo no Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da UNESP de Botucatu.

À Jennifer Machado Soares, que desenvolveu seu projeto de iniciação científica dentro desta pesquisa, agradeço sua dedicação, colaboração e todas as contribuições.

Ao Laboratório Maricondi, pela parceria estabelecida na realização de hemogramas e esfregaços de amostras sanguíneas.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem participar do processo de avaliação deste trabalho e pelas valiosas contribuições.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPG-Biotec) da UFSCar, pela oportunidade e pelo apoio financeiro na participação de congressos internacionais.

À Claudia Pastega, secretária do PPG-Biotec, que sempre, com muito carinho, ajudou a resolver todos os problemas. Obrigada por todo apoio.

Ao Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP), Grupo de Óptica e Laboratório de Biofotônica, pela infraestrutura e oportunidade de realizar esta pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Biofotônica do Grupo de Óptica do IFSC, que acompanharam esta jornada, obrigada pela convivência e pelos momentos alegres.

Aos membros da secretaria do Grupo de Óptica do IFSC, que sempre ajudaram com documentações, ofícios e toda questão burocrática.

Ao CEPOF, pelo apoio financeiro.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Muito obrigada!

“É preciso que eu suporte duas ou três larvas
se quiser conhecer as borboletas”

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

CORRÊA, T. Q. **Técnicas ópticas para o controle microbiológico de sangue**. 2017. 119p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

O sangue, considerado um meio altamente nutritivo, pode ser alvo de contaminações bacterianas, fúngicas, virais e parasitárias. Bolsas de sangue contendo eritrócitos, plaquetas e plasma, utilizadas na hemoterapia para transfusão, também são alvos de contaminações podendo desencadear aos pacientes sérias doenças, principalmente, infecções sanguíneas. Quando não detectadas ou tratadas rapidamente, estas infecções são capazes de evoluir para um quadro de sepse, uma das principais causas de morte em unidades de terapia intensiva. Algumas técnicas ópticas podem ser empregadas no controle microbiológico de sangue e, neste estudo, a inativação fotodinâmica e a radiação ultravioleta foram avaliadas na descontaminação *in vitro* do sangue total, dos eritrócitos e do plasma rico em plaquetas com *Staphylococcus aureus*, uma das principais bactérias relacionadas a estas infecções. Para a inativação fotodinâmica de *S. aureus*, Photogem® associado à luz 630 nm e Photodithazine® associado à luz 660 nm foram avaliados em PBS e em sangue total sendo a toxicidade determinada por ensaios de hemólise e viabilidade celular. O Photogem® mostrou menor taxa de hemólise (10,7%) para os eritrócitos avaliados em sangue total quando comparada à taxa do Photodithazine® (55,7%), por isso os demais ensaios foram realizados apenas com o Photogem®. As reduções de *S. aureus* em PBS, sangue total, eritrócitos e plasma rico em plaquetas nas condições 15 J/cm² e 50 µg/mL foram de 7,2 log₁₀, 1,0 log₁₀, 1,3 log₁₀ e 0,4 log₁₀ UFC/mL, respectivamente. As análises quantitativas e qualitativas do sangue total mostraram-se normais, no entanto, a hemólise dos eritrócitos quando avaliados isoladamente, na ausência do plasma, foi de 100%. O ensaio de viabilidade celular mostrou elevados índices de apoptose nos eritrócitos isolados, mas viabilidade normal nas plaquetas. A análise do Photogem® com o sangue total mostrou maior interação com o plasma, contudo, na ausência do plasma, o Photogem® acumulou-se na membrana dos eritrócitos. Para a radiação UVC (254 nm), diferentes fluências foram analisadas em *S. aureus* em PBS e em sangue total, e a toxicidade da técnica foi determinada pelo ensaio de viabilidade celular. As reduções de *S. aureus* em PBS, sangue total, eritrócitos e plasma rico em plaquetas foram de 6,5 log₁₀ (0,78 J/cm²), 1,7 log₁₀ (23 J/cm²), 1,1 log₁₀ (21 J/cm²) e 2,5 log₁₀ UFC/mL (23 J/cm²), respectivamente. Foram observadas pequenas diferenças na absorção do plasma em função do tempo de irradiação, o que sugere pouca degradação das proteínas plasmáticas após a irradiação com a máxima fluência (23 J/cm²). O ensaio de viabilidade celular mostrou índices normais para os eritrócitos na máxima fluência, sugerindo ausência de dano nestas células. Contudo, nas plaquetas foi observado elevado índice de apoptose, o que indica danos a estes fragmentos celulares na maior fluência estudada. Assim, as técnicas ópticas mostraram efeitos de danos opostos em cada hemocomponente, sendo que, de acordo com o alvo que se quer descontaminar, o emprego de uma ou outra técnica deverá ser avaliado juntamente com as melhores condições de inativação microbiana e de preservação dos componentes sanguíneos, para garantir o controle microbiológico do sangue.

Palavras-chave: Inativação fotodinâmica. Radiação ultravioleta. Sangue. Descontaminação. *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

CORRÊA, T. Q. **Optical techniques for the microbiological control of blood**. 2017. 119p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

Blood, considered a highly nutritive medium, can be the target of bacterial, fungal, viral and parasitic contamination. Blood bags containing erythrocytes, platelets, and plasma, used in hemotherapy for transfusion, are also targets of contamination, which can trigger serious diseases, especially blood infections. When these infections are not detected or treated rapidly, they can progress to sepsis, a leading cause of death in intensive care units. Some optical techniques may be used in the microbiological control of blood. In this study, photodynamic inactivation and ultraviolet radiation were evaluated in the *in vitro* decontamination of whole blood, erythrocytes, and platelet-rich plasma with *Staphylococcus aureus*, one of the main bacteria related to these infections. For photodynamic inactivation of *S. aureus*, Photogem® with 630 nm light and Photodithazine® with 660 nm light were evaluated in PBS and whole blood, with toxicity determined by hemolysis and cell viability assays. Photogem® showed a lower hemolysis rate for erythrocytes (10.7%) evaluated in whole blood, compared to Photodithazine® (55.7%), so the other tests were performed only with Photogem®. The reductions of *S. aureus* in PBS, whole blood, erythrocytes, and platelet-rich plasma at 15 J/cm² and 50 µg/mL were 7.2 log₁₀, 1.0 log₁₀, 1.3 log₁₀ and 0.4 log₁₀ CFU/mL, respectively. Quantitative and qualitative analyses of whole blood were normal. However, erythrocytes hemolysis, in the absence of plasma, was 100%. The cell viability assay showed high apoptosis rates in the isolated erythrocytes, indicating the destructive action of this technique, but normal platelet viability. Photogem® analysis with whole blood showed greater interaction with plasma, however, in the absence of plasma, Photogem® accumulated on the erythrocyte membrane. For UVC radiation (254 nm), different light doses were analyzed in *S. aureus* in PBS and whole blood, and the cell viability assay determined the toxicity of the technique. The reductions of *S. aureus* in PBS, whole blood, erythrocytes and platelet-rich plasma were 6.5 log₁₀ (0.78 J/cm²), 1.7 log₁₀ (23 J/cm²), 1.1 log₁₀ (21 J/cm²) and 2.5 log₁₀ CFU/mL (23 J/cm²), respectively. The relatively small differences in plasma uptake as a function of irradiation time were observed, suggesting little degradation of plasma proteins after irradiation with the maximum light dose (23 J/cm²). The cell viability assay showed normal rates for erythrocytes at 23 J/cm², suggesting no damage in these cells. However, in the platelets, a high apoptosis rate was observed, indicating damage to these cell fragments in the highest light dose studied. Therefore, the optical techniques showed opposite damage effects in each blood component, and according to the decontaminated target, the use of one or another technique should be evaluated together with the best microbial inactivation and blood components preservation conditions to ensure microbiological control of blood.

Keywords: Photodynamic inactivation. Ultraviolet radiation. Blood. Decontamination. *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Hematopoese. Esquema evidenciando a formação, desenvolvimento e diferenciação dos elementos celulares do sangue.....28
- Figura 2** - Processo de obtenção dos hemocomponentes, concentrados de eritrócitos, plasma rico em plaquetas, concentração de plaquetas, plasma fresco congelado e crioprecipitado, através de duas centrifugações seriadas do sangue total. 32
- Figura 3** - Representação esquemática do diagrama de Jablonski mostrando os processos fotofísicos envolvidos na inativação fotodinâmica e seu mecanismo de ação.....37
- Figura 4** - Estrutura química do monômero da molécula de Photogem®. A estrutura química monomérica do Photogem® tem a fórmula representada por $[C_{34}H_{38}N_4O_6]_n$. Nos radicais R₁ e R₂ ligam-se CH(OH)CH₃, CH=CH₂ ou a própria estrutura monomérica da porfirina. Nos ligantes R₃ e R₄ ligam-se H ou a própria estrutura monomérica da porfirina, podendo formar dímeros, trímeros e oligômeros. 40
- Figura 5** - Espectro de absorção do Photogem® na concentração de 50 µg/mL, em PBS, com detalhe para a banda de Soret em 369 nm e para as bandas-Q em 507, 540, 570 e 620 nm. 40
- Figura 6** - Estrutura química do monômero da molécula de Photodithazine®..... 41
- Figura 7** - Espectro de absorção do Photodithazine® na concentração de 20 µg/mL, em PBS, com a banda de Soret em 401 nm e bandas-Q em 505, 600 e 665 nm..... 42
- Figura 8** - Espectros de absorção da hemoglobina e das suas formas variantes, carboxi-hemoglobina, oxi-hemoglobina e meta-hemoglobina. 43
- Figura 9** - Ilustração da dimerização da timina e do efeito mutagênico da radiação UV no material genético..... 48
- Figura 10** - Desenho esquemático do grau de dano causado pela irradiação UV, nos diferentes comprimentos de onda, aos agentes patogênicos (bactérias, parasitas, vírus) e às proteínas... 50
- Figura 11** - Foto ilustrativa dos equipamentos utilizados na irradiação das amostras. (A) *Biotable* no comprimento de onda 630 nm. (B) *Biotable* no comprimento de onda 660 nm... 55
- Figura 12** - Representação esquemática da análise da distribuição das células marcadas com Anexina V e iodeto de propídeo pelos quadrantes do *dot plot* gerado na citometria de fluxo. 60
- Figura 13** - Medida de temperatura do sangue total durante irradiação no comprimento de onda 630 nm em função do tempo. Intensidade da irradiação: 30 mW/cm². Os valores expressam a média e o desvio padrão..... 61

- Figura 14** - Sobrevivência de *S. aureus* em PBS após IFD com Photogem® em função das fluências $L = 0, 15$ e 30 J/cm^2 (630 nm), e das concentrações de FS = 0, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Os valores expressam a média e o desvio padrão. 62
- Figura 15** - Sobrevivência de *S. aureus* em PBS após IFD com Photodithazine® em função das fluências $L = 0, 15$ e 30 J/cm^2 (660 nm), e das concentrações de FS = 0, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Os valores expressam a média e o desvio padrão. 63
- Figura 16** - Sobrevivência de *S. aureus* em sangue total após IFD com Photogem® em função das fluências $L = 0, 10$ e 15 J/cm^2 (630 nm), e das concentrações de FS = 0, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Os valores expressam a média e o desvio padrão. 65
- Figura 17** - Sobrevivência de *S. aureus* em sangue total após IFD com Photodithazine® em função das fluências $L = 0, 10$ e 15 J/cm^2 (660 nm), e das concentrações de FS = 0, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Os valores expressam a média e o desvio padrão. 65
- Figura 18** - Espectro de absorção da hemoglobina evidenciando as bandas de absorção nos comprimentos de onda 278, 345, 413, 542 e 577 nm. 68
- Figura 19** - Porcentagem de hemólise dos eritrócitos em sangue total após IFD com Photogem® em função das fluências $L = 0, 10$ e 15 J/cm^2 (630 nm), e das concentrações de FS = 0, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Os valores expressam a média e o desvio padrão. 69
- Figura 20** - Porcentagem de hemólise dos eritrócitos em sangue total após IFD com Photodithazine® em função das fluências $L = 0, 10$ e 15 J/cm^2 (660 nm), e das concentrações de FS = 0, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Os valores expressam a média e o desvio padrão. 70
- Figura 21** - Imagens de esfregaços de sangue total após IFD com Photogem® nas fluências $L = 0$ e 15 J/cm^2 (630 nm) e na concentração de FS = 50 $\mu\text{g/mL}$. As imagens foram obtidas em microscópio óptico com aumento de 100x. A escala está representada em barra na cor preta no canto inferior direito e corresponde a 20 μm 73
- Figura 22** - Sobrevivência de *S. aureus* em eritrócitos e em plasma rico em plaquetas após IFD com Photogem® em função das fluências $L = 0, 10$ e 15 J/cm^2 (630 nm), e das concentrações de FS = 0, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Os valores expressam a média e o desvio padrão. . 75
- Figura 23** - Porcentagem de hemólise dos eritrócitos após IFD com Photogem® em função das fluências $L = 0, 10$ e 15 J/cm^2 (630 nm), e das concentrações de FS = 0, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Os valores expressam a média e o desvio padrão. 76
- Figura 24** - Espectros de absorção do sangue total (A), dos eritrócitos (B) e do plasma rico em plaquetas (C) nas concentrações de Photogem® FS = 0; 6,25; 12,5; 25; 31,25; 37,5; 50; 62,5; 125 $\mu\text{g/mL}$ 78

| | |
|--|----|
| Figura 25 - (A) Imagem de luz transmitida dos eritrócitos na ausência de Photogem® com emissão de fluorescência endógena (600-700 nm). (B) Imagem de luz transmitida superposta à imagem de fluorescência do Photogem® na concentração 50 µg/mL (emissão: 600-700 nm). As imagens foram obtidas em microscópio confocal e a escala está representada em barra na cor branca no canto inferior direito e corresponde a 100 µm..... | 80 |
| Figura 26 - (A) Imagem espectral de fluorescência dos eritrócitos com Photogem® na concentração 50 µg/mL. A imagem foi obtida em microscópio confocal e a escala está representada em barra na cor branca no canto inferior direito e corresponde a 20 µm. (B) Emissão da fluorescência de duas regiões de um eritrócito. A curva em preto representa a emissão de fluorescência do interior do eritrócito e a em vermelho representa a emissão de fluorescência da membrana do eritrócito..... | 80 |
| Figura 27 - Ensaio de citometria de fluxo evidenciando os <i>dot plots</i> com as porcentagens de viabilidade dos eritrócitos nas condições: (A) controle, (B) controle do Photogem® FS = 50 µg/mL, (C) eritrócitos com tamanho normal após IFD com Photogem® FS = 50 µg/mL e fluência L = 15 J/cm ² (630 nm) e (D) eritrócitos com tamanho reduzido após IFD com Photogem® FS = 50 µg/mL e fluência L = 15 J/cm ² (630 nm). | 81 |
| Figura 28 - Ensaio de citometria de fluxo evidenciando os <i>dot plots</i> com as porcentagens de viabilidade das plaquetas nas condições: (A) controle, (B) controle do Photogem® FS = 50 µg/mL e (C) IFD com Photogem® FS = 50 µg/mL e fluência L = 15 J/cm ² (630 nm). | 83 |
| Figura 29 - Foto ilustrativa do equipamento Surface UV, composto por uma lâmpada que emite radiação UVC no comprimento de onda 254 nm. | 88 |
| Figura 30 - Representação esquemática da análise da distribuição das células marcadas com Anexina V e iodeto de propídeo pelos quadrantes do <i>dot plot</i> gerado na citometria de fluxo. 90 | |
| Figura 31 - Sobrevivência de <i>S. aureus</i> em sangue total após irradiação com luz UVC (254 nm) em função do tempo de irradiação (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 minutos). Os valores expressam a média e o desvio padrão. | 92 |
| Figura 32 - Sobrevivência de <i>S. aureus</i> em eritrócitos após irradiação com luz UVC (254 nm) em função do tempo de irradiação (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 minutos). Os valores expressam a média e o desvio padrão..... | 94 |
| Figura 33 - Sobrevivência de <i>S. aureus</i> em plasma rico em plaquetas após irradiação com luz UVC (254 nm) em função do tempo de irradiação (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 minutos). Os valores expressam a média e o desvio padrão. | 95 |
| Figura 34 - Espectros de absorção do plasma rico em plaquetas após irradiação com luz UVC (254 nm) nos tempos de irradiação: 0, 6, 12, 18, 24 e 30 minutos..... | 96 |

Figura 35 - Ensaio de citometria de fluxo evidenciando os *dot plots* com as porcentagens de viabilidade dos eritrócitos nas condições: (A) controle e (B) irradiação com luz UVC (254 nm) no maior tempo de irradiação (30 minutos). 97

Figura 36 - Ensaio de citometria de fluxo evidenciando os *dot plots* com as porcentagens de viabilidade das plaquetas nas condições: (A) controle e (B) irradiação com luz UVC (254 nm) no maior tempo de irradiação (30 minutos). 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros avaliados na inativação fotodinâmica de *S. aureus* em PBS, em sangue total e nos hemocomponentes..... 56

Tabela 2 - Análise quantitativa do sangue total após IFD com Photogem® nas fluências $L = 0$ e 15 J/cm^2 (630 nm) e na concentração de FS = $50 \text{ }\mu\text{g/mL}$. Os valores de referência mostrados na tabela são para mulheres e os valores dos grupos de estudo expressam a média e o desvio padrão. 72

Tabela 3 - Parâmetros avaliados na descontaminação do sangue total e dos hemocomponentes por radiação UVC, no comprimento de onda 254 nm..... 88

Tabela 4 - Log (UFC/mL) da sobrevivência de *S. aureus* em PBS após irradiação com luz UVC (254 nm) nos tempos 0, 1, 3 e minutos. Os valores expressam a média e o desvio padrão para cada tempo de irradiação. 91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------------------------|--|
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| BHI | <i>Brain Heart Infusion</i> |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico (do inglês: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>) |
| EDTA K2 | Ácido Etilenodiamino Tetra-acético Dipotássico |
| EROs | Espécies Reativas de Oxigênio |
| FITC | Isotiocianato de Fluoresceína (do inglês: <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>) |
| FS | Fotossensibilizador |
| FSs | Fotossensibilizadores |
| Hb | Hemoglobina |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>) |
| Hp | Hematoporfirina |
| HpD | Derivado de Hematoporfirina (do inglês: <i>Hematoporphyrin Derivative</i>) |
| IFD | Inativação Fotodinâmica |
| IFSC | Instituto de Física de São Carlos |
| LAT | Laboratório de Apoio Tecnológico |
| LDL | Lipoproteína de Baixa Intensidade (do inglês: <i>Low-Density Lipoprotein</i>) |
| LEDs | Diodos Emissores de Luz (do inglês: <i>Light Emitting Diode</i>) |
| L ₍₋₎ FS ₍₋₎ | Grupo controle |
| L ₍₊₎ FS ₍₋₎ | Grupo controle da luz |
| L ₍₋₎ FS ₍₊₎ | Grupo controle do fotossensibilizador |
| L ₍₊₎ FS ₍₊₎ | Grupo inativação fotodinâmica |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| PBS | Tampão Fosfato Salino (do inglês: <i>Phosphate Buffered Saline</i>) |
| PI | Iodeto de Propídeo (do inglês: <i>Propidium Iodide</i>) |
| RNA | Ácido Ribonucleico (do inglês: <i>Ribonucleic Acid</i>) |
| rpm | Rotação por Minuto |
| SIDA | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida |
| SRIS | Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica |
| TFD | Terapia Fotodinâmica |
| TSB | Triptona de Soja (do inglês: <i>Tryptic Soy Broth</i>) |
| UFC | Unidade Formadora de Colônia |

| | |
|------------------------|--|
| UFSCar | Universidade Federal de São Carlos |
| UNESP | Universidade Estadual Paulista |
| USP | Universidade de São Paulo |
| UTI | Unidade de Terapia Intensiva |
| UV | Ultravioleta |
| UVC | Ultravioleta C |
| °C | Grau Celsius |
| $^3\text{O}_2$ | Oxigênio Triplete |
| $^1\text{O}_2$ | Oxigênio Singleto |
| O_2^- | Ânion Superóxido |
| OH^- | Radical Hidroxila |
| H_2O_2 | Peróxido de Hidrogênio |
| L | Litro |
| μg | Micrograma |
| μL | Microlitro |
| mg | Miligrama |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| nm | Nanômetro |
| μM | Micromolar |
| $\mu\text{mol/L}$ | Micromol por Litro |
| $\mu\text{g/mL}$ | Micrograma por Mililitro |
| mg/mL | Miligrama por Mililitro |
| mW/cm^2 | Miliwatt por Centímetro Quadrado |
| J/cm^2 | Joule por Centímetro Quadrado |
| UFC/mL | Unidade Formadora de Colônia por Mililitro |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 19 |
| 2 MOTIVAÇÃO..... | 25 |
| 3 OBJETIVOS..... | 27 |
| 3.1 Objetivo Geral..... | 27 |
| 3.2 Objetivos Específicos..... | 27 |
| 4 REVISÃO DA LITERATURA..... | 28 |
| 4.1 Sangue e seus constituintes..... | 28 |
| 4.2 Hemocomponentes..... | 31 |
| 4.3 Infecções sanguíneas..... | 33 |
| 4.4 <i>Staphylococcus aureus</i> | 35 |
| 4.5 Inativação fotodinâmica..... | 36 |
| 4.5.1 Photogem®..... | 39 |
| 4.5.2 Photodithazine®..... | 41 |
| 4.5.3 Inativação fotodinâmica em sangue..... | 42 |
| 4.6 Radiação ultravioleta..... | 47 |
| 5 CAPÍTULO 1 - DESCONTAMINAÇÃO FOTODINÂMICA DO SANGUE..... | 53 |
| 5.1 Objetivos Específicos..... | 53 |
| 5.2 Material e Métodos..... | 54 |
| 5.2.1 Amostras de sangue..... | 54 |
| 5.2.2 Cultivo do micro-organismo..... | 54 |
| 5.2.3 Fotossensibilizadores..... | 54 |
| 5.2.4 Fonte de luz..... | 55 |
| 5.2.5 Determinação da variação de temperatura nas amostras sanguíneas..... | 56 |
| 5.2.6 Grupos de estudo e desenho experimental..... | 56 |
| 5.2.7 IFD de <i>S. aureus</i> em PBS, em sangue total e em hemocomponentes..... | 57 |
| 5.2.8 Ensaios de hemólise..... | 57 |
| 5.2.9 Análise quantitativa e qualitativa do sangue total..... | 58 |
| 5.2.10 Análise da interação entre Photogem® e sangue..... | 58 |
| 5.2.11 Ensaios de viabilidade celular..... | 59 |
| 5.3 Resultados e Discussão..... | 61 |
| 5.3.1 Determinação da variação de temperatura nas amostras de sangue..... | 61 |

| | |
|---|-----|
| 5.3.2 IFD de <i>S. aureus</i> em PBS, em sangue total e análise da hemólise..... | 62 |
| 5.3.3 Análise quantitativa e qualitativa do sangue total após IFD com Photogem® | 71 |
| 5.3.4 IFD de <i>S. aureus</i> nos hemocomponentes e análise da hemólise..... | 74 |
| 5.3.5 Análise da interação entre Photogem® e sangue | 77 |
| 5.3.6 Análise da viabilidade dos eritrócitos e das plaquetas após IFD com Photogem® ... | 81 |
| 5.4 Conclusões parciais | 85 |
| | |
| 6 CAPÍTULO 2 - DESCONTAMINAÇÃO ULTRAVIOLETA DO SANGUE..... | 86 |
| 6.1 Objetivos Específicos | 86 |
| 6.2 Material e Métodos..... | 87 |
| 6.2.1 Amostras de sangue..... | 87 |
| 6.2.2 Cultivo do micro-organismo | 87 |
| 6.2.3 Fonte de luz | 87 |
| 6.2.4 Descontaminação UVC de <i>S. aureus</i> em PBS, em sangue e em hemocomponentes | 89 |
| 6.2.5 Absorção UV-VIS do plasma rico em plaquetas | 89 |
| 6.2.6 Ensaio de viabilidade celular..... | 90 |
| 6.3 Resultados e Discussão..... | 91 |
| 6.3.1 UVC em <i>S. aureus</i> em PBS | 91 |
| 6.3.2 UVC em <i>S. aureus</i> em sangue total..... | 92 |
| 6.3.3 UVC em <i>S. aureus</i> em hemocomponentes..... | 93 |
| 6.3.4 Análise do plasma rico em plaquetas após radiação UVC | 96 |
| 6.3.5 Análise da viabilidade dos eritrócitos e das plaquetas após radiação UVC | 97 |
| 6.4 Conclusões parciais | 100 |
| | |
| 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 101 |
| | |
| 8 CONCLUSÕES | 104 |
| | |
| 9 PERSPECTIVAS FUTURAS | 105 |
| | |
| REFERÊNCIAS | 106 |
| | |
| ANEXO A – Publicações e colaborações..... | 116 |
| ANEXO B – Trabalhos completos publicados em anais de congresso..... | 117 |
| ANEXO C – Capítulos de livros publicados | 118 |
| ANEXO D – Participação em eventos | 119 |

1 INTRODUÇÃO

O sangue é um tecido vital e indispensável para a manutenção da vida. É um tecido líquido e nutritivo que flui pelo sistema circulatório transportando oxigênio, nutrientes, hormônios, eletrólitos, água e diversas outras substâncias. O sangue é responsável por nutrir todos os tecidos e órgãos, e também por diminuir os resíduos do metabolismo celular e toxinas. Além disso, o sistema de defesa do organismo contra doenças e contra agentes invasores sejam eles micro-organismos patogênicos ou substâncias estranhas também é feito pelo sangue, mais especificamente pelos leucócitos presentes neste tecido.

Como é altamente nutritivo, o sangue pode ser alvo de contaminações bacterianas, fúngicas, virais e parasitárias e, dependendo da quantidade desses invasores e do estado imunológico do indivíduo, conseguem provocar infecções sanguíneas. Essas infecções podem se tornar um grave problema uma vez que o sangue sendo fluido é capaz de transportar, além das substâncias já mencionadas, os micro-organismos nele presentes e, desta maneira, outros focos infecciosos podem surgir em diferentes órgãos. Esse quadro infeccioso pode levar o organismo a desenvolver sepse, uma das doenças responsáveis pelo elevado índice de mortalidade em unidades de terapia intensiva (UTI).

A sepse é uma reação inflamatória sistêmica, grave e complexa, decorrente de um processo infeccioso, resultado de interações do patógeno e da resposta imune do indivíduo, com sinalizações pró-inflamatórias e pró-coagulantes, podendo ter sido causada por bactérias, fungos, vírus e protozoários. Estudos têm mostrado um aumento na incidência de sepse ao longo dos anos e isso se deve, principalmente, ao aumento da resistência microbiana aos antibióticos. (1–4) No passado, a medicina teve um grande avanço no tratamento das doenças infecciosas com a descoberta da penicilina e, ao longo dos anos, novos antibióticos foram sintetizados e tornaram-se cada vez mais populares no tratamento de infecções. Com isso, pensava-se que as infecções tinham sido controladas. No entanto, apesar dos avanços conseguidos no tratamento de doenças ocasionadas por bactérias, fungos e vírus e, apesar da existência de vários métodos de controle microbiano, cepas microbianas resistentes a antibióticos são identificadas a uma taxa exponencialmente crescente, sendo este um desafio não só para a área médica, mas também para a ciência como um todo.

A resistência aos antibióticos é uma resposta dos micro-organismos ao seu uso indevido, errôneo e indiscriminado em seres humanos e ao seu uso abusivo na agropecuária, principalmente nos animais, o que afeta diretamente toda a população. Embora esse fenômeno de resistência ocorra naturalmente através da adaptação microbiana ao meio ambiente, ele tem

sido acelerado pelo uso frequente e excessivo dos antimicrobianos. Dessa maneira, as bactérias deixam de ser sensíveis aos seus efeitos, sendo necessários princípios ativos cada vez mais agressivos para eliminá-las e, conseqüentemente, cada vez mais tóxicos para os seres humanos.

Diversos são os fatores envolvidos com o processo de seleção de micro-organismos resistentes aos antibióticos, dentre eles estão a falta de regulamentação e supervisão do uso; adesão fraca à terapia pelos pacientes; uso não terapêutico e vendas sem receituário médico. Algumas das principais conseqüências diretas da resistência microbiana incluem o desenvolvimento de doenças mais graves e doenças mais prolongadas, e a incapacidade de tratar com sucesso as infecções, levando ao aumento da mortalidade. Já as conseqüências indiretas estão relacionadas com os custos mais elevados para o sistema de saúde, além das implicações na economia global. (5)

Nas últimas décadas, tem-se presenciado a emergência e disseminação de bactérias resistentes a múltiplos agentes antibacterianos, resultado da recorrência cada vez maior aos antibióticos de último recurso, altamente tóxicos e que, com o passar do tempo, também perderão sua eficácia. Já existem, atualmente, superbactérias que resistem até mesmo aos antibióticos de última geração, condição preocupante especialmente para os pacientes que se encontram em ambientes hospitalares, os principais locais que abrigam micro-organismos resistentes. Por isso, infecções causadas por bactérias multirresistentes têm sido consideradas doenças emergentes no mundo todo e um sério problema de saúde pública.

No âmbito das infecções sanguíneas, existem diversas fontes possíveis de contaminação. Uma delas pode ocorrer no momento da coleta de sangue, já que bactérias da microbiota da pele podem contaminar o sangue ou até mesmo a presença assintomática de bactérias no sangue do doador podem ser a fonte de contaminação. Tais contaminações ocorrem, principalmente, como resultado da desinfecção incorreta da pele e são mais prevalentes em bolsas de sangue com concentrados de plaquetas, pois são armazenadas à temperatura ambiente, em torno de 20 a 24°C. Já as bolsas de sangue com concentrados de eritrócitos não são alvos muito comuns de contaminações, já que são armazenadas em temperatura baixa, em torno de 2 a 6°C, dificultando o crescimento de bactérias. (6,7)

Os micro-organismos mais frequentemente encontrados nos concentrados de plaquetas são as bactérias Gram-positivas, especialmente *Staphylococcus spp.*, presentes na microbiota da pele, e também um número variado de bactérias Gram-negativas. (8) Assim, um grande número de espécies bacterianas é capaz de proliferar rapidamente seja no sangue total ou nos hemocomponentes, já que são considerados meios ricos em nutrientes. Estima-se que o nível de contaminação durante a coleta de sangue seja relativamente baixo, na ordem de 1 a 10

unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) de sangue e podem atingir níveis de cerca de 10^6 UFC/mL dentro de algumas horas. (9,10)

Esta quantidade de bactérias, em um curto período de tempo, pode levar a várias mudanças basais no indivíduo e até mesmo a mudanças mais severas. Dentre os fatores que contribuem para a gravidade desta condição, pode-se citar o volume de sangue contaminado infundido ao paciente, a espécie da bactéria e seu potencial de virulência, e o estado clínico do paciente. Os alvos mais comuns para o desenvolvimento de infecções sanguíneas são recém-nascidos, pacientes imunossuprimidos, idosos com deficiência nutricional importante e aqueles que, ao mesmo tempo, estão fazendo uso de antibióticos. Mesmo assim, indivíduos saudáveis, que foram transfundidos também podem ser afetados, evoluindo para casos fatais, dependendo da carga de toxinas produzidas pelas bactérias. (9)

Quando o sangue de um indivíduo está infectado por bactérias, este apresenta um quadro de bacteremia transitória que pode ser diagnosticada por meio de exames de hemocultura. Embora seja uma doença assintomática ou com sintomas leves, quando não tratada pode evoluir para uma infecção e, esta infecção, dependendo do estado de saúde do indivíduo, pode levar a complicações fisiológicas muito sérias, provocando uma síndrome inflamatória sistêmica. Os tratamentos convencionais utilizados neste caso consistem na administração de antimicrobianos e medicamentos específicos para a correção das alterações hemodinâmicas e dos distúrbios metabólicos.

Para se ter ideia da grandeza da problemática envolvida com as contaminações de sangue, as infecções sanguíneas são consideradas uma das principais causas de morte e a sepse resultante deste tipo de infecção afeta anualmente cerca de 18 milhões de pessoas no mundo todo e 700.000 somente nos Estados Unidos, sendo a taxa de mortalidade em torno de 30 a 40%. Tanto a sepse quanto outras infecções bacterianas agressivas associadas às infecções sanguíneas necessitam, na maioria das vezes, ser tratadas em UTIs, o que gera altos custos associados não somente aos encargos de saúde, mas também aos encargos econômicos e sociais. (3)

No Brasil, a taxa de mortalidade por sepse vem se mostrando elevada em recém-nascidos, sendo necessário priorizar ações preventivas contra infecções relacionadas à assistência à saúde. A deficiência na imunidade dos bebês, a microbiota existente na UTI neonatal e os procedimentos invasivos muitas vezes necessários para auxiliar os recém-nascidos favorecem o aparecimento de infecções nesta faixa etária. Juntamente a isso, as rupturas das barreiras naturais da pele permitem que micro-organismos oportunistas afetem os

recém-nascidos com disseminação na corrente sanguínea, fato que ocorre principalmente em bebês prematuros em virtude da imaturidade do sistema imunológico. (11)

Outro procedimento preocupante quanto às contaminações está relacionado à transfusão de sangue, pois pode ser considerada uma fonte potencial de infecção por vários agentes microbianos. No Brasil, cerca de 3,5 milhões de pessoas realizam transfusões de sangue por ano. (12) A transfusão de hemocomponentes (concentrado de eritrócitos, concentrado de plaquetas, plasma fresco e crioprecipitado) e de hemoderivados (albumina, globulinas e concentrado de fatores de coagulação) faz parte da vida de muitos pacientes, particularmente dos portadores de doenças hematológicas e daqueles submetidos a procedimentos invasivos. A transfusão é considerada uma tecnologia relevante na terapêutica moderna, pois salva vidas e melhora a saúde dos pacientes. Mas, assim como outras intervenções terapêuticas, pode levar a complicações agudas ou tardias ao apresentar risco de transmissão de agentes infecciosos e consequente desenvolvimento de doenças infecciosas. (13)

Desde 1980, com o reconhecimento da contaminação pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) no fornecimento de sangue, apenas sangue sem risco algum é aceitável e várias medidas de segurança transfusional foram implementadas para alcançar esse nível de segurança. Desse modo, com a redução da transmissão do HIV pelas transfusões sanguíneas, o risco de contaminação por outros microorganismos surgiu como a maior ameaça residual de doenças infecciosas transmissíveis por transfusão. Diversas doenças podem ser transmitidas pelas transfusões, as mais importantes são as hepatites B e C, a SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), a sífilis, a malária e a doença de Chagas. (7)

Existem algumas estratégias para reduzir o risco de infecções sanguíneas e garantir a segurança no procedimento de transfusão de sangue. Uma delas é a prevenção realizada através da triagem dos doadores, para detectar possíveis riscos de infecção ou bacteremia transitória, e através da preparação da pele, com a correta desinfecção para diminuir a carga bacteriana no local da punção. Outra estratégia é a detecção bacteriana nas amostras sanguíneas, de modo que o tempo de detecção seja rápido, antes mesmo que as bactérias alcancem níveis perigosos de contaminação. Pode ser feita pela identificação das bactérias através de cultura, testes sorológicos específicos e técnicas de biologia molecular. Por fim, a inibição do crescimento bacteriano pela adição de antibióticos nos hemocomponentes foi por um tempo considerada, mas não foi adotada devido aos riscos que as reações medicamentosas podem oferecer e ao potencial de desenvolvimento de resistência antibiótica.

Até o presente momento, os tratamentos convencionais utilizados para inativar micro-organismos patogênicos no sangue total e nos hemocomponentes foram desenvolvidos basicamente contra os contaminantes virais. (14,15) No entanto, o sangue pode conter outros agentes patogênicos, como bactérias, especialmente de infecções pré-sintomáticas ou até mesmo bactérias exógenas, em particular as da pele (7,9,16), e também parasitas. (17,18) Tratamentos térmicos como pasteurização, por exemplo, foram avaliados para aplicação em plasma, mas não se mostraram eficazes para todos os tipos de micro-organismos e, além disso, apresentam riscos de danos às proteínas presentes no plasma. (19)

Outro tipo de tratamento utilizado no sangue é a purificação, com aplicação de técnicas de nanofiltração e de cromatografia utilizando anticorpos específicos adsorvidos. Esses processos podem ser problemáticos para remover as menores partículas na presença de proteínas de alto peso molecular e não são indicados para os concentrados de plaquetas e de eritrócitos, pois as membranas celulares podem se ligar não especificamente aos anticorpos. (15,19) A filtração e a lavagem celular, considerados métodos físicos, podem auxiliar na remoção de micro-organismos patogênicos extracelulares, mas não conseguem ter efeito sobre aqueles localizados no interior das células. (15)

Considerando que as estratégias para reduzir o risco de infecções sanguíneas e os tratamentos convencionais utilizados para controlar micro-organismos no sangue sejam realizados na prática, ainda assim, são insuficientes para garantir que todo sangue destinado à população esteja livre de quaisquer micro-organismos. Com isso, a transmissão de agentes microbianos pode ocorrer, aumentando as chances de desenvolvimento de certas doenças nos indivíduos receptores de sangue. Além disso, o período de "janela" no qual os agentes infecciosos podem não ser detectados é uma das principais causas associadas à transmissão de micro-organismos patogênicos.

A hemoterapia no Brasil tem se preocupado em desenvolver tecnologias que minimizem os riscos transfusionais, principalmente aqueles relacionados à disseminação de agentes infecciosos. Desse modo, o grande desafio da hemoterapia tem sido manter um estoque de bolsas de sangue com qualidade e que atenda a demanda da população, visto que a taxa de descarte de material sanguíneo ainda é alta, variando de 10 a 20%. Os descartes de bolsas ocorrem devido à reprovação pelo controle de qualidade, por conter material contaminado ou mal conservado, o que leva a consideráveis perdas sociais e financeiras. (20)

Por tais motivos, o controle microbiológico do sangue e dos hemocomponentes é ainda um tema de grande importância na área médica e novas alternativas necessitam ser estudadas para aumentar a segurança no fornecimento de sangue e auxiliar no tratamento de

infecções sanguíneas, visando melhorar o quadro clínico dos pacientes acometidos por tais infecções. E, para garantir a qualidade das bolsas de sangue e contribuir com os níveis desse material nos bancos de sangue, é imprescindível que os parâmetros de qualidade sejam seguidos e que técnicas confiáveis de descontaminação possam auxiliar na melhoria dessa situação. Desse modo, esta pesquisa buscou investigar a ação de duas técnicas ópticas para o controle microbiológico de sangue: a inativação fotodinâmica e a radiação ultravioleta, que serão descritas detalhadamente nas seções subsequentes.

2 MOTIVAÇÃO

De acordo com o panorama exposto anteriormente e com a dimensão que as infecções provenientes de contaminações sanguíneas podem atingir, tem-se buscado novas alternativas para o tratamento e para o controle dos micro-organismos, já que os tratamentos disponíveis hoje não tem sido suficientes para controlar a proliferação dos agentes infecciosos. Neste contexto, associar novas terapias às já existentes pode ser um dos caminhos que auxilie na solução deste problema. Essa foi uma das motivações para dar início a esta pesquisa, no intuito de analisar técnicas possíveis de serem aplicadas como procedimentos auxiliares no controle microbiológico do sangue.

Uma das técnicas propostas para este estudo foi a terapia fotodinâmica (TFD) ou inativação fotodinâmica (IFD), termo mais utilizado para as pesquisas que visam o controle microbiológico. Ela vem sendo utilizada no tratamento de diversos tumores, com ótimos resultados, pois atua na destruição de células tumorais, preservando os tecidos saudáveis. Também tem sido aplicada no tratamento de infecções microbianas de diferentes naturezas, como por exemplo em micoses de unha, feridas contaminadas e candidíase oral, apresentando resultados positivos sendo, portanto, promissora no controle de muitos agentes patogênicos. Além disso, é vantajosa porque é considerada de baixo custo.

De modo geral, o processo de IFD envolve o uso de uma substância denominada fotossensibilizador (FS) que, ao ser ativado por luz em comprimento de onda específico na presença de oxigênio molecular é capaz de interagir com outras moléculas presentes no meio, gerando principalmente espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas substâncias são as principais responsáveis por induzir células tumorais e micro-organismos à morte. Em relação à descontaminação de sangue, a IFD tem sido estudada, contudo a maioria dos estudos foi realizada em componentes sanguíneos separados, ou seja, em concentrados de eritrócitos, em concentrados de plaquetas e até mesmo em plasma, mas não em sangue total.

Portanto, a proposta desta pesquisa foi investigar, inicialmente, o sangue total para entender as relações entre FS, luz e sangue no processo de inativação microbiana, pensando em uma futura aplicação hemoterápica e clínica. Por esse motivo, os FSs escolhidos para o estudo foram duas substâncias aprovadas para uso em TFD no Brasil, uma vez que a maioria dos trabalhos realizados nesta área pesquisou substâncias específicas desenvolvidas para aplicação em hemocomponentes ou substâncias quimicamente modificadas para aplicação em micro-organismos alvos, não sendo autorizadas para uso na clínica.

A outra técnica proposta para este estudo foi a radiação ultravioleta (UV), especificamente a radiação UVC, por apresentar efeito germicida e mecanismo de ação já conhecidos. A radiação UVC tem sido utilizada no controle de micro-organismos nas mais diversas aplicações, tais como desinfecção de água, de alimentos, esterilização de ambientes, descontaminação do ar e também no processo de produção de medicamentos e cosméticos. Também é considerada uma alternativa importante aos processos de descontaminação de ambientes hospitalares, contribuindo para a diminuição do potencial risco de infecções adquiridas nestes locais.

A motivação para investigar a radiação UVC em contaminantes presentes no sangue surgiu de outra pesquisa desenvolvida durante o doutorado, na qual a ação de um dispositivo óptico, denominado *Surface UV*, foi comprovada e protocolos seguros para sua aplicação, em superfícies em geral, foram estabelecidos. Assim, a radiação UVC foi investigada nesta pesquisa no intuito de explorar seu uso clínico e propor a técnica como abordagem auxiliar no tratamento de infecções sanguíneas, na descontaminação do sangue e dos hemocomponentes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi analisar a possibilidade de descontaminar *in vitro* o sangue total e os hemocomponentes através de duas técnicas ópticas: a inativação fotodinâmica, utilizando como fotossensibilizadores o Photogem® e o Photodithazine®, associados aos comprimentos de onda 630 nm e 660 nm, respectivamente; e a radiação ultravioleta, utilizada no comprimento de onda 254 nm, que corresponde à radiação UVC.

3.2 Objetivos Específicos

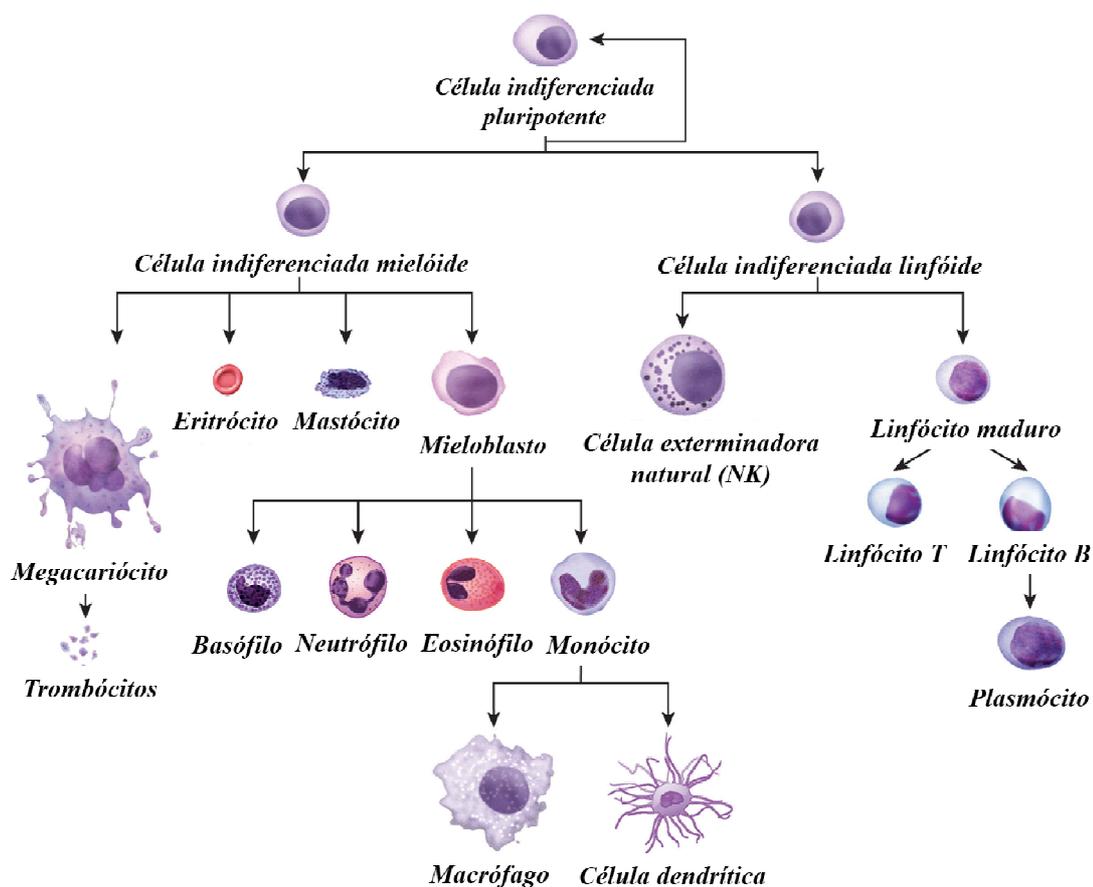
Os objetivos específicos deste estudo são apresentados separadamente para cada técnica óptica analisada. Assim, no Capítulo 1 estão discriminados os objetivos específicos relacionados à inativação fotodinâmica para o controle microbiológico do sangue e, no Capítulo 2 estão discriminados os objetivos específicos relacionados à radiação ultravioleta para o controle microbiológico do sangue.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Sangue e seus constituintes

O sangue é um tecido fluido composto por uma fase líquida amarelada que corresponde ao plasma, e por uma fase sólida que compreende os elementos celulares, os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas. Os elementos celulares correspondem a cerca de 45% do volume de sangue de um indivíduo, enquanto o plasma corresponde a 55% deste volume. (21,22) Na Figura 1 está esquematizado a hematopoese com todos os elementos celulares.

Figura 1 - Hematopoese. Esquema evidenciando a formação, desenvolvimento e diferenciação dos elementos celulares do sangue.



Fonte: Adaptada de Orkin e Zon (2008). (23)

Os eritrócitos, hemácias ou glóbulos vermelhos são as células mais numerosas no sangue. São produzidas em um tecido localizado na medula óssea, o tecido hematopoiético, e

são encarregadas pelo transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e do dióxido de carbono, resultante do metabolismo celular, dos tecidos para os pulmões. São células bicôncavas, em formato discoide, com 7 a 8 µm de diâmetro, anucleadas, sem organelas citoplasmáticas e muito flexíveis para percorrem os menores vasos sanguíneos do organismo. O tempo de vida destas células é em torno de 100 a 120 dias e são produzidas em uma velocidade de 2 milhões por segundo. Desse modo, em condições normais, os seres humanos têm em média cerca de 5 milhões de eritrócitos por microlitro de sangue. Quando estão velhos, suas membranas tornam-se frágeis e são removidos da circulação pelo baço. (21,22,24)

A hemoglobina (Hb) é a principal constituição dos eritrócitos e é quem confere a coloração avermelhada dessas células. É uma metaloproteína constituída por quatro moléculas proteicas e quatro grupamentos heme, cada um com um átomo de ferro. Os átomos de ferro são capazes de se ligar frouxamente aos átomos de oxigênio, sendo, portanto facilmente reversível, facilitando a sua captação nos capilares pulmonares e a sua liberação nos capilares dos tecidos. Já o hematócrito corresponde à massa de eritrócitos existente no sangue, ou seja, é o percentual do volume de sangue ocupado pelos eritrócitos, e representa o índice de concentração dessas células no sangue. Assim, correlaciona-se com a quantidade de Hb existente no sangue. (22)

Os leucócitos são responsáveis pela defesa do organismo contra a invasão de agentes patogênicos, como bactérias, fungos e vírus, e contra a invasão de substâncias estranhas e tóxicas. São unidades móveis do sistema de defesa do organismo, pois são capazes de sair da corrente sanguínea e migrar para os tecidos onde sua ação seja necessária. Desse modo, os leucócitos são transportados pelo sangue para as diferentes partes do organismo, onde atuarão na defesa rápida contra quaisquer agentes invasores. O tempo de vida destas células em circulação no sangue é curto, em torno de 6 a 8 horas e duram de 2 a 3 dias nos tecidos. Portanto, a maior parte dos leucócitos fica armazenada, sendo liberados para a circulação apenas quando são requisitados. (21,24)

Normalmente, existem cerca de 6.000 a 10.000 leucócitos por microlitro de sangue, sendo que 60 a 70% são neutrófilos, 21 a 35% são linfócitos, 4 a 8% são monócitos, 2 a 4% são eosinófilos e 0 a 1% são basófilos. Neutrófilos, eosinófilos e basófilos são chamados de leucócitos polimorfonucleares por apresentarem núcleos com dois ou mais lobos e são originados do mieloblasto. Os monócitos quando migram do sangue para os tecidos originam os macrófagos e as células dendríticas. Já os linfócitos são originados do linfoblasto e incluem as células natural killer e os linfócitos T e B (Figura 1). (21,22)

As plaquetas ou trombócitos são fragmentos de células ou corpúsculos citoplasmáticos responsáveis pelo processo de hemostasia, coagulação do sangue e cicatrização. São originadas de células gigantes denominadas megacariócitos, formadas na medula óssea. Para dar origem às plaquetas, o citoplasma dos megacariócitos fragmenta-se em várias porções, que ficam completamente envolvidas por uma membrana. Quando os megacariócitos se rompem, liberam as plaquetas na circulação sanguínea. Por isso, as plaquetas não são consideradas células e sim fragmentos de uma célula, e medem cerca de 2 a 4 μm de diâmetro. (21,22,24)

A concentração de plaquetas no sangue varia de 150.000 a 400.000 por microlitro de sangue sendo que, a cada 10 dias, as plaquetas circulantes são totalmente substituídas. A principal função das plaquetas no processo de hemostasia – conjunto de mecanismos que mantém o sangue fluido dentro do vaso, impedindo um sangramento – é aderir no local de lesão do endotélio de um vaso sanguíneo, promovendo aglutinação e formação de grumos plaquetários, responsáveis por obstruir o local e interromper a perda sanguínea. Além disso, as plaquetas participam ativamente da cascata de coagulação do sangue, ativando diversos fatores de coagulação, que promovem a retração do coágulo. Portanto, são constituintes sanguíneos importantes na manutenção do organismo. (21,22)

Já a parte líquida do tecido sanguíneo é composta pelo plasma, constituído por 91% de água, 7% de proteínas e 2% de solutos não proteicos, como lipídeos, glicose, eletrólitos, sais, minerais, hormônios, vitaminas e produtos residuais. As proteínas são o principal componente do plasma e são responsáveis por manter algumas características biofísicas do sangue, como pressão osmótica, viscosidade e densidade. A proteína de maior proporção presente no plasma é a albumina, e as que estão em menor proporção são as globulinas, relacionadas com a formação de anticorpos, e o fibrinogênio, fundamental no processo de coagulação do sangue. Os outros constituintes do plasma relacionam-se com o equilíbrio eletrolítico, equilíbrio ácido-básico, nutrição dos tecidos e regulação hormonal do organismo. O pH do plasma é levemente básico, entre 7,35 e 7,45, e caracteriza-se por resistir às variações bruscas de pH, pois dispõe de mecanismos de defesa contra essas alterações. (22,24)

As principais características relevantes na interação entre os componentes sanguíneos e as moléculas de FS durante as reações de IFD estão relacionadas com a membrana celular dos eritrócitos, que são as células mais abundantes do tecido sanguíneo, e com as moléculas presentes no plasma. De um modo geral, as membranas plasmáticas são barreiras seletivas que garantem a composição interna das células por meio do controle da transferência ativa e passiva de inúmeras moléculas. A membrana dos eritrócitos consiste em uma bicamada

fosfolipídica composta por 49,2% de proteínas, 43,6% de lipídeos e 7,2% de carboidratos. As proteínas são classificadas em proteínas transmembranas, que atravessam a bicamada lipídica, responsáveis por manter a carga negativa dos eritrócitos, impedir aglutinação dos mesmos, além de serem o canal transportador de ânions e água para a célula; e em proteínas periféricas, situadas na base da bicamada lipídica, que formam o citoesqueleto e atuam na preservação da forma e flexibilidade dos eritrócitos. Os lipídeos presentes nas membranas eritrocitárias são responsáveis por conferir fluidez à membrana, tornando-a flexível. Quaisquer alterações que possam ocorrer nos componentes da membrana dos eritrócitos podem resultar em mudanças na forma e na funcionalidade destas células, com consequente aumento de sua destruição. (25)

Já em relação às moléculas presentes no plasma sanguíneo, a albumina é a principal proteína responsável por ligar, transportar e metabolizar várias substâncias que entram em contato com o sangue, como por exemplo, íons, medicamentos, hormônios. Além disso, a albumina está relacionada à propriedades antioxidantes, pois se liga a substâncias como o ferro, o cobre, o cromo e o níquel, reduzindo a disponibilidade destes compostos nas reações pró-oxidantes. As ligações entre essas substâncias e a albumina relacionam-se com um grupo tiol exposto no resíduo de cisteína livre presente na albumina, que atua como sequestrador de radicais livres. (26,27)

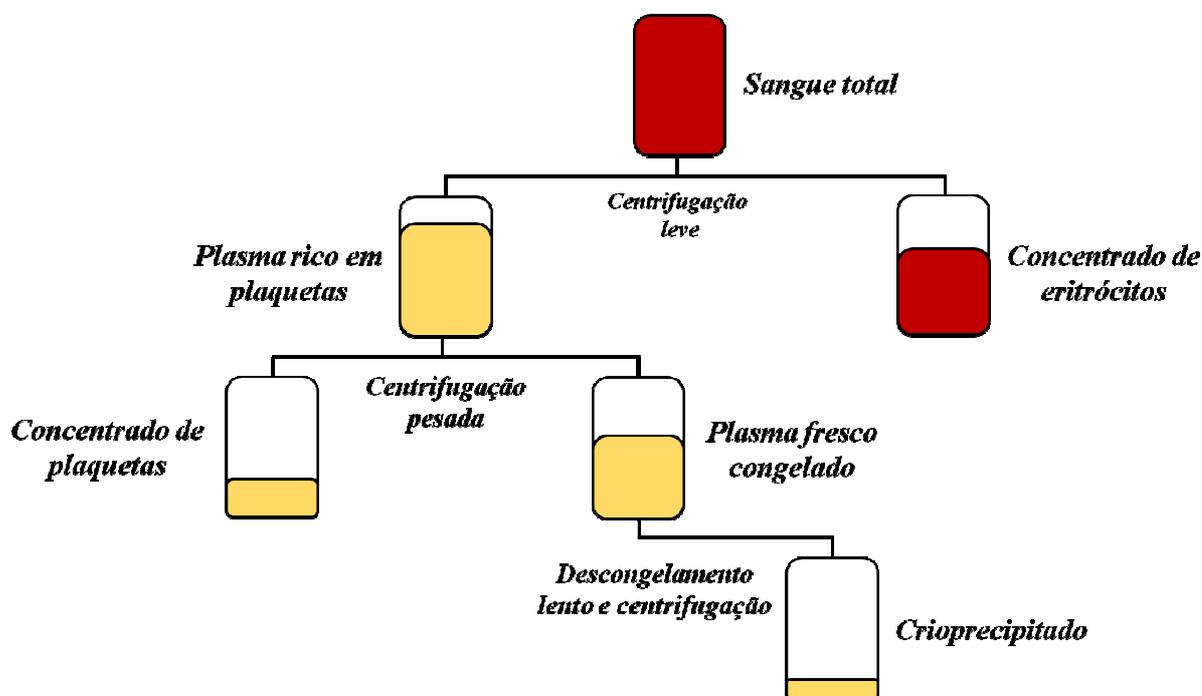
Deste modo, tanto as membranas dos eritrócitos quanto a albumina presente no plasma são fatores importantes e devem ser levados em consideração no que diz respeito à IFD aplicada no sangue total, pois são os dois principais constituintes sanguíneos que podem afetar, direta ou indiretamente, as reações fotodinâmicas ocorridas no sangue.

4.2 Hemocomponentes

No passado, a transfusão de sangue total era um procedimento muito comum, no entanto, não há mais a indicação do uso de bolsas de sangue total na terapia transfusional. A tendência tem sido utilizar os hemocomponentes, que são os produtos originados a partir do sangue total por meio de processos físicos realizados na hemoterapia. Com esses processos, o fracionamento de uma bolsa de sangue total proporciona a obtenção de quatro componentes sanguíneos distintos, sendo eles o concentrado de eritrócitos, concentrado de plaquetas, plasma fresco e crioprecipitado, que podem ser doados para quatro pacientes diferentes de acordo com as necessidades de cada um. (13)

O processo de obtenção dos hemocomponentes ocorre através de duas centrifugações seriadas do sangue total (Figura 2). A primeira consiste em centrifugação leve para obtenção do concentrado de eritrócitos e do plasma rico em plaquetas. A segunda consiste em centrifugação pesada do plasma rico em plaquetas, resultando no concentrado de plaquetas e no plasma fresco congelado. Já o crioprecipitado é obtido do descongelamento lento do plasma fresco congelado com posterior centrifugação para obtenção do precipitado. (13)

Figura 2 - Processo de obtenção dos hemocomponentes, concentrados de eritrócitos, plasma rico em plaquetas, concentração de plaquetas, plasma fresco congelado e crioprecipitado, através de duas centrifugações seriadas do sangue total.



Fonte: Adaptada de Brasil, Ministério da Saúde. (13)

Os concentrados de eritrócitos são utilizados em diversas condições clínicas, tais como anemias crônicas, hemorragias agudas, hipóxia por perda de sangue após trauma ou cirurgia. São armazenados em solução de preservação e possuem vida útil de 35 dias quando armazenados em temperatura adequada, que varia de 2 a 6°C. (28–30) Os concentrados de plaquetas são indicados para prevenir ou tratar hemorragias em pacientes que possuam alterações na função plaquetária. São armazenados sob agitação suave em temperatura de 20 a 24°C, e sua vida útil é em torno de 5 dias. (30) O plasma fresco é utilizado no tratamento de

coagulopatias, isto é, doenças relacionadas aos distúrbios da coagulação sanguínea. Deve ser congelado logo após seu processo de obtenção e ser armazenado em -30°C por até 1 ano. O crioprecipitado, por possuir elevadas concentrações de fibrinogênio e fibronectina, é indicado no controle ou na prevenção de hemorragias relacionadas à diminuição destes fatores. Deve ser armazenado em -18°C por até 1 ano. (13,28,29,31)

Os hemocomponentes também podem ser alvos de contaminação por bactérias, fungos, vírus e protozoários e, com isso, ao serem transfundidos, podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de infecções nos indivíduos receptores. (31) As taxas de contaminação são mais elevadas para as frações de plasma ou para os produtos derivados dele, como é o caso dos concentrados de plaquetas, devido à combinação de plasma obtido de doações múltiplas. Além disso, como este hemocomponente é armazenado em temperatura que varia de 20°C a 22°C , pode favorecer o crescimento de eventuais micro-organismos. (15) Portanto, é preciso que se faça o controle das possíveis contaminações, para garantir a segurança no processo de transfusão dos hemocomponentes.

4.3 Infecções sanguíneas

As infecções sanguíneas são doenças relacionadas à presença de micro-organismos viáveis no sangue, detectadas pelo resultado positivo de uma ou mais culturas de sangue, além de ensaios de biologia molecular. São de grande relevância diagnóstica, pois frequentemente estão associadas a um aumento considerável nas taxas de morbidade e mortalidade, além de representar uma das mais significativas complicações no processo infeccioso. Geralmente, tais infecções provocam uma resposta inflamatória caracterizada pela alteração dos parâmetros clínicos, laboratoriais e hemodinâmicos (32,33), e podem resultar de uma infecção primária do sistema cardiovascular, como por exemplo, a partir de um cateter contaminado, ou podem ser secundárias e resultar de uma infecção localizada em algum órgão, como por exemplo, pneumonia, endocardite, meningite, infecção do trato urinário, entre outras. (32)

As condições que predisõem um indivíduo às infecções sanguíneas incluem idade, doenças de base, medicamentos como corticoides e quimioterápicos, e alguns procedimentos médicos invasivos, como é o caso dos cateteres e dos procedimentos endoscópicos. (33) O maior risco em adquirir a infecção sanguínea está presente nos indivíduos portadores de doenças hematológicas, doenças neoplásicas, diabetes mellitus, insuficiência renal em diálise, cirrose hepática e imunodepressão. Alguns procedimentos cirúrgicos, como os do trato

geniturinário e os gastrointestinais são também fatores que predispõem ao risco. (32,34) Assim, pode-se categorizar a aquisição destas infecções em três principais grupos: (I) indivíduos imunologicamente normais; (II) indivíduos com o sistema imune comprometido (idosos) e com o sistema imune imaturo (recém-nascidos); (III) indivíduos em condições patológicas ou farmacológicas, que os predispõem a infecções. (34)

Em torno de 80% das infecções sanguíneas estão associadas às infecções primárias, sendo que a maioria ocorre devido às infecções de cateter vascular e dispositivos intravasculares, e os outros 20% estão relacionados às infecções secundárias. Os micro-organismos mais frequentes encontrados em infecções sanguíneas primárias, em pacientes hospitalizados com cateteres venosos, são *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Candida spp.*, *Enterobacter spp.*, enterococos e estafilococos coagulase-negativos. (35)

O padrão dos micro-organismos que causam infecções no sangue tem mudado ao longo dos anos, sendo encontrado um número cada vez maior de infecções ocasionadas por bactérias Gram-negativas e por fungos. No entanto, nas últimas duas décadas, a mudança mais significativa na etiologia das infecções sanguíneas não esteve relacionada ao tipo de micro-organismo infectante, mas sim ao fato de serem micro-organismos resistentes a antibióticos. Com isso, as opções de tratamentos para estas infecções têm se tornado cada vez mais escassas e, em regra, o tratamento indicado tem sido empregar a terapia combinada de antimicrobianos. (34,36) Este cenário traz ainda mais preocupação pelo fato das infecções sanguíneas ocorrerem em uma época em que a descoberta de novas moléculas antimicrobianas tem sido limitada. (32)

Quando as infecções não são controladas, podem evoluir para um conjunto de alterações graves, capazes de ocasionar uma resposta inflamatória em todo o organismo. Esse processo inflamatório é conhecido por Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS). A SRIS pode ter causas não infecciosas, como é o caso de pós-operatórios de cirurgias grandes e circulação extracorpórea, contudo quando a SRIS tem origem infecciosa, é denominada sepse. (1,3) Antigamente, a sepse era conhecida como septicemia ou infecção generalizada, mas a utilização desses termos não é totalmente correta, uma vez que a infecção não está, necessariamente, presente em todos os órgãos. Em geral, o diagnóstico infeccioso encontra-se em um órgão ou sistema, sendo o suficiente para causar o processo inflamatório em todo o organismo. Assim, é definida como resposta sistêmica a uma doença infecciosa causada por bactérias, fungos ou vírus. Estimativas apontam a existência de aproximadamente 600 mil novos casos de sepse a cada ano no Brasil, sendo as consequências da sepse responsáveis, em média, por 250 mil casos de óbito. (2)

Portanto, fica evidente a dimensão do problema relacionado às infecções sanguíneas e às contaminações no sangue para a área médica, farmacêutica e para os sistemas de saúde em geral, que sofrem com os elevados custos gerados no tratamento destas infecções e no controle dos micro-organismos.

4.4 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva pertencente ao gênero *Staphylococcus* e à família Micrococcaceae. Suas células, com aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, possuem a forma de cocos e frequentemente estão agrupadas em cachos ou aglomerados. A distinção de *S. aureus* em relação às outras espécies de estafilococos é feita com base na pigmentação ouro que suas colônias apresentam e nos resultados positivos para coagulase, fermentação com manitol e testes de desoxirribonuclease. (37)

É uma bactéria comumente encontrada na microbiota normal da cavidade bucal, da garganta, das fossas nasais, da pele e do intestino de 30% a 50% dos indivíduos saudáveis. No entanto, em condições de imunossupressão, a presença de *S. aureus* pode favorecer a ocorrência de infecções e o risco de desenvolvimento destas infecções torna-se maior em indivíduos com diabetes tipo 1, pacientes submetidos à hemodiálise, pacientes pós cirúrgicos, usuários de drogas intravenosas e indivíduos com SIDA. (38) Assim, a capacidade de um micro-organismo causar doença é uma função não só da sua virulência intrínseca, mas também da competência imunológica do indivíduo e da capacidade de eliminar micro-organismos invasores pela atuação de suas barreiras de defesa.

S. aureus é um importante patógeno humano causador de diversas infecções. É responsável por ocasionar doenças que variam desde infecções simples, pouco ameaçadoras, como infecções cutâneas, até infecções mais graves e letais, como pneumonia, meningite, endocardite, intoxicação alimentar, infecções sanguíneas e sepse. É considerado o segundo maior agente etiológico de infecções sanguíneas e a principal causa de morte associada a essas infecções. (39,40) Além disso, é uma das espécies de maior interesse médico por ser o principal agente etiológico de bacteremia em todo o mundo. (41–44) A bacteremia por *S. aureus* tem uma taxa de mortalidade relatada de até 40% e frequentemente está associada a infecções complicadas, o que exige a permanência hospitalar prolongada dos pacientes e aplicação de fortes terapias antibióticas. (41,45)

As frequências de infecções por esta bactéria adquiridas no ambiente hospitalar têm aumentado constantemente e o tratamento das infecções tem se tornado cada vez mais difícil devido às cepas resistentes a múltiplos fármacos. (38) Apesar de *S. aureus* ter sido uma das primeiras bactérias a ser controlada com a descoberta dos antibióticos, tornou-se uma das espécies de maior importância no quadro das infecções hospitalares e comunitárias devido a sua enorme capacidade de adaptação, sendo encontrada com frequência em muitos casos de sepse. (38) Por tais motivos e como ainda hoje esta bactéria continua ser um patógeno versátil e perigoso para seres humanos, novas abordagens para o controle deste micro-organismo são necessárias. E, por ser um micro-organismo de fácil cultivo, foi escolhido como principal foco de investigação nesta pesquisa.

4.5 Inativação fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) foi descoberta no começo do século XX por Oscar Raab, estudante de medicina, que observou um efeito deletério no tratamento de *Paramecium caudatum* com aplicação do corante laranja de acridina e exposição accidental à luz solar. Logo após, esse efeito foi melhor descrito e elucidado por Jesionek e von Tappeiner, professores de Raab, que relataram em 1903 o efeito tumoricida da associação de eosina com exposição à luz branca em tumores de pele. Com isso, conceberam o termo *ação fotodinâmica*. (46)

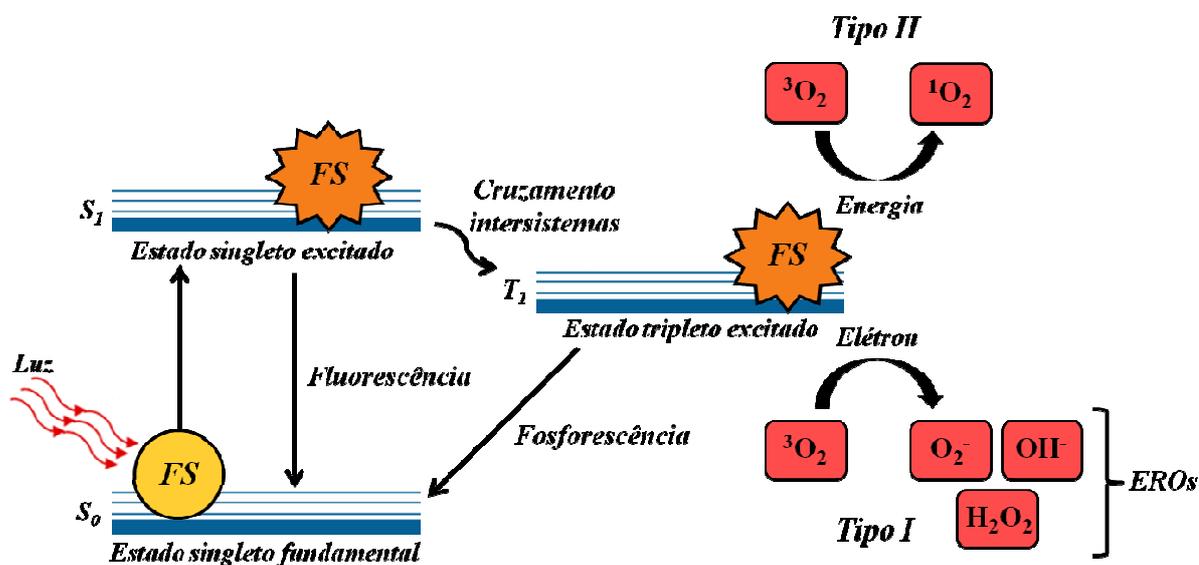
A TFD é considerada uma modalidade terapêutica alternativa e promissora para tratamentos de diversos tipos de câncer. (47,48) As vantagens na utilização desta técnica para o tratamento de tumores estão na baixa toxicidade gerada ao organismo, por utilizar substâncias fotossensíveis pouco citotóxicas no escuro, e nas fontes de irradiação que empregam luz visível. Além disso, a seletividade das substâncias fotossensíveis empregadas reduzem os efeitos colaterais em comparação com outras modalidades terapêuticas, como por exemplo, a quimioterapia e a cirurgia.

Embora a descoberta da TFD tenha ocorrido na área da microbiologia, sua aplicação no tratamento de infecções microbianas perdeu força devido ao surgimento dos antibióticos em 1940. (49) No entanto, com o aparecimento de linhagens microbianas resistentes aos antimicrobianos, novas técnicas para a inativação de micro-organismos foram impulsionadas e, desde então, a TFD tem sido uma boa alternativa no tratamento de várias infecções, com resultados eficientes na inativação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como de fungos e vírus. (50,51) Quando empregada na área de microbiologia, para controlar ou

inativar micro-organismos, a TFD é chamada de inativação fotodinâmica (IFD) e, nos últimos anos, a IFD tem sido aplicada com sucesso na descontaminação oral de pacientes ortodônticos (52), no tratamento de onicomicose (53–55), no tratamento de faringotonsilite (56) e de candidíase oral (57,58), e em outras infecções bacterianas e fúngicas. (49,59,60)

O mecanismo de ação da IFD consiste na ação conjunta de três elementos, que correspondem a uma molécula fotossensível não tóxica, conhecida como fotossensibilizador (FS), à luz em comprimento de onda adequado que seja capaz de ativar o FS e ao oxigênio molecular presente no meio. A combinação desses três elementos promove a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), como por exemplo os radicais livres e o oxigênio singlete, ambos responsáveis pelo dano citotóxico. (60–62) Os processos fotofísicos envolvidos na IFD e seu mecanismo de ação são mostrados na Figura 3.

Figura 3 - Representação esquemática do diagrama de Jablonski mostrando os processos fotofísicos envolvidos na inativação fotodinâmica e seu mecanismo de ação.



Fonte: Adaptada de Kashef (2017). (63)

A molécula de FS, quando em equilíbrio termodinâmico, encontra-se no estado fundamental singlete (S_0). Ao absorver luz em comprimento de onda adequado, a molécula sofre uma transição para estados singletos excitados (S_n) e relaxa para estados de menor energia (S_1). Muitas moléculas de FS neste estado de vida curto podem decair e voltar ao estado fundamental ($S_1 \rightarrow S_0$) e esse decaimento pode ocorrer por vários processos.

Em um primeiro processo, a molécula de FS pode decair diretamente para o estado fundamental perdendo energia pela emissão de um fóton, ou seja, emitindo luz, processo chamado fluorescência. Em um segundo processo, a molécula de FS pode ser convertida para um estado tripleto excitado ($S_1 \rightarrow T_1$) através de cruzamento intersistemas, envolvendo a inversão de spin eletrônico. Neste estado tripleto, a molécula de FS pode decair para o estado fundamental emitindo fosforescência, processo que envolve a transição entre os estados tripleto e singleto fundamental ($T_1 \rightarrow S_0$), ou pode ainda sofrer duas reações distintas:

- (I) reagir com moléculas vizinhas ou estruturas biológicas por transferência de elétrons, formando radicais livres, que por sua vez, reagem com o oxigênio produzindo as EROs que incluem o ânion superóxido, o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio, processo chamado de reação do tipo I; ou
- (II) reagir com o oxigênio molecular em seu estado fundamental tripleto (3O_2) por transferência de energia, gerando o oxigênio singleto (1O_2), espécie muito reativa do oxigênio capaz de oxidar biomoléculas, processo chamado de reação do tipo II. (63,64)

Os dois tipos de reações (tipo I e tipo II) podem ocorrer durante a IFD e o que define a proporção em que tais reações vão ocorrer depende do tipo de FS usado, das concentrações de oxigênio e substrato, e afinidade do FS com o substrato. (49,64) Tanto as EROs originadas nas reações tipo I quanto o oxigênio singleto originado nas reações tipo II podem causar danos e desencadear morte nos micro-organismos. No entanto, as reações tipo II são consideradas o principal mecanismo envolvido no processo de morte celular. (65)

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das espécies reativas, porém a membrana celular é um dos mais atingidos. O mecanismo de dano na membrana celular ocorre pela oxidação de lipídeos, acarretando em alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana, que provocam a perda da seletividade e da troca iônica, além da formação de produtos citotóxicos. Outros mecanismos relacionados com a morte celular incluem oxidação de aminoácidos em proteínas, inativação de enzimas e danos oxidativos em ácidos nucleicos com conseqüente alteração do funcionamento normal do patógeno. (59,63)

Desse modo, os danos induzidos pela IFD aos constituintes dos micro-organismos podem resultar em consideráveis mudanças morfológicas e funcionais nas células microbianas. As alterações morfológicas compreendem os danos diretos na membrana celular, que levam ao extravasamento do conteúdo intracelular e conseqüente inativação do sistema de transporte via membrana. Já os danos funcionais compreendem a perda de atividades

enzimáticas, a oxidação de proteínas e a inibição de processos metabólicos celulares, como por exemplo, síntese de material genético, transporte de substâncias, entre outros. (63,66)

Em geral, os FSs são compostos pouco tóxicos e inativos em seu estado fundamental. São considerados os principais veículos da IFD, pois quando iluminados com comprimentos de onda específicos, permitem que as reações responsáveis pelos produtos reativos aconteçam. (66) Para ser utilizado em IFD, um FS eficaz precisa apresentar algumas características fotofísicas e fotoquímicas específicas, como estabilidade, facilidade de solubilização, permeabilidade em membrana citoplasmática, seletividade pelas células-alvo, longo tempo de vida no estado excitado, alto rendimento na produção de EROS e de oxigênio singlete, e baixa toxicidade no escuro. (67)

Portanto, espera-se que no processo da IFD tanto o FS quanto a luz não sejam tóxicos e não tenham a capacidade de produzir efeitos deletérios no micro-organismo, quando estiverem isolados, pois o sucesso da IFD depende fortemente da interação entre FS, luz e oxigênio, combinação capaz de originar as potentes espécies reativas que induzem o dano oxidativo nos micro-organismos. (61)

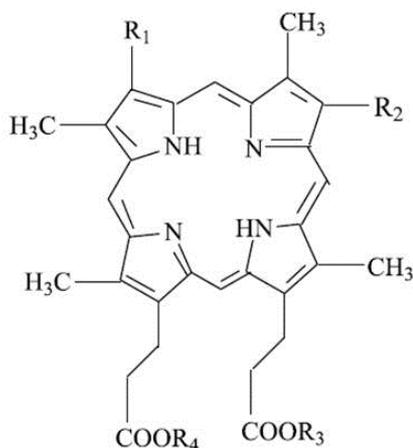
Os FSs escolhidos para serem utilizados nesta pesquisa foram o Photogem® (Limited Liability Company Photogem, Moscou, Rússia), pertencente à classe das porfirinas, e o Photodithazine® (Veta-Grand Company, Moscou, Rússia), pertencente à classe das clorinas. Ambos são FSs comerciais e aprovados para uso em humanos como medicamentos para o tratamento de câncer com TFD.

4.5.1 Photogem®

O Photogem® é um composto derivado de hematoporfirina (HpD, do inglês *Hematoporphyrin Derivative*) e considerado um FS de primeira geração. A hematoporfirina (Hp), composto isolado da hemoglobina, é uma substância muito utilizada como FS em tratamento de câncer com TFD, pois exhibe propriedades de localização tumoral. Sua purificação levou à produção de HpD, substâncias com misturas de componentes complexos que apresentam melhor localização tumoral do que a própria Hp. (68–70)

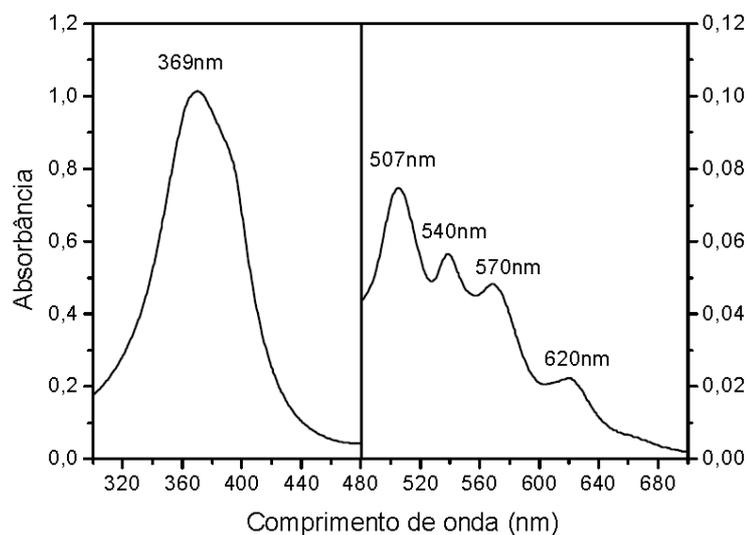
O Photogem® consiste em uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros e sua estrutura química está apresentada na Figura 4. Apresenta-se na forma de um pó violeta escuro e seu espectro de absorção possui cinco bandas, sendo uma intensa na região de 370 nm, conhecida como banda de Soret, e outras quatro de menor intensidade, conhecidas como bandas-Q, nos comprimentos de onda 507, 540, 570 e 620 nm (Figura 5).

Figura 4 - Estrutura química do monômero da molécula de Photogem®. A estrutura química monomérica do Photogem® tem a fórmula representada por $[C_{34}H_{38}N_4O_6]_n$. Nos radicais R_1 e R_2 ligam-se $CH(OH)CH_3$, $CH=CH_2$ ou a própria estrutura monomérica da porfirina. Nos ligantes R_3 e R_4 ligam-se H ou a própria estrutura monomérica da porfirina, podendo formar dímeros, trímeros e oligômeros.



Fonte: RÚSSIA (1999) *apud* Menezes (2006). (70)

Figura 5 - Espectro de absorção do Photogem® na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, em PBS, com detalhe para a banda de Soret em 369 nm e para as bandas-Q em 507, 540, 570 e 620 nm.



Fonte: Menezes (2006). (70)

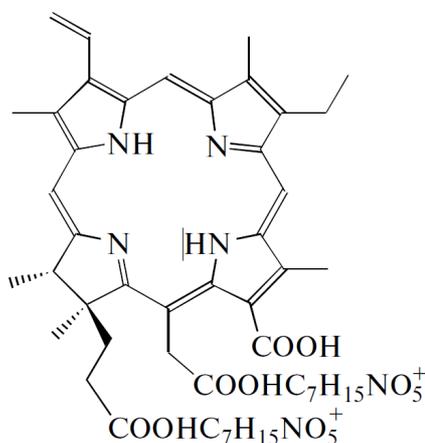
Este FS foi aprovado pelo Comitê Estatal de Farmacologia da Federação Russa para uso médico (68) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para ser aplicado no tratamento de câncer por TFD, no Brasil. (70) Além disso, o Photogem® tem sido amplamente utilizado como FS na IFD de diversos micro-organismos, em estudos *in vitro* e *in*

vivo, exibindo reduções significativas em *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* em estudo com dentina cariada (71), em espécies de *Candida*, incluindo *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (72), em *C. albicans* e *C. glabrata* resistentes ao fluconazol (73), em *S. aureus* (74), em *Pythium insidiosum*, oomiceto causador da pitiose (75,76), em larvas de *Aedes aegypti* (77), entre outros.

4.5.2 Photodithazine®

O Photodithazine® é um FS derivado da clorina e6, obtido a partir da cianobactéria *Spirulina platensis*. A formulação desse composto contém uma mistura de derivados de clorina e6, além de clorina e6 conjugada com 0,5% de N-metil-D-glicosamina, substância que atua como agente solubilizante e estabilizante, tornando-o solúvel em água. (78–80) A estrutura química do Photodithazine® está apresentada na Figura 6.

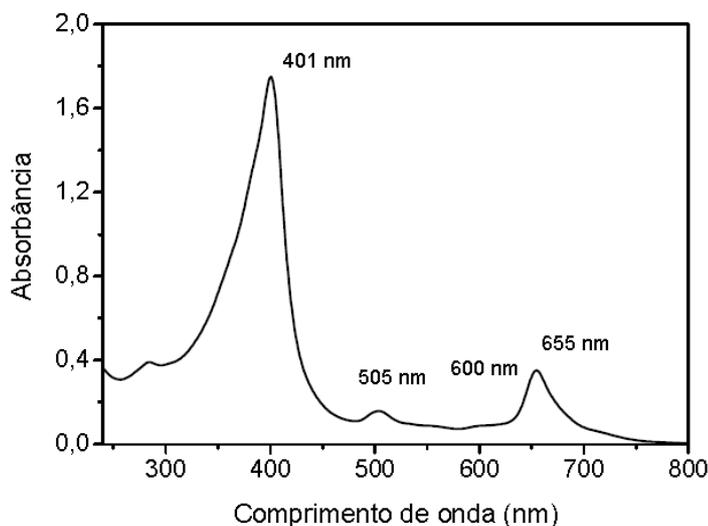
Figura 6 - Estrutura química do monômero da molécula de Photodithazine®.



Fonte: Corrêa (2012). (80)

O Photodithazine® apresenta-se na forma de um líquido verde escuro e seu espectro de absorção possui quatro bandas, sendo uma intensa na região de 400 nm, conhecida como banda de Soret e outras três de menor intensidade, conhecidas como bandas-Q, nos comprimentos de onda 505, 600 e 655 nm (Figura 7).

Figura 7 - Espectro de absorção do Photodithazine® na concentração de 20 µg/mL, em PBS, com a banda de Soret em 401 nm e bandas-Q em 505, 600 e 665 nm.



Fonte: Corrêa (2006). (81)

Esse FS tem sido aplicado com sucesso no tratamento de câncer com TFD devido ao seu alto rendimento quântico na formação de oxigênio singlete. (78) De acordo com alguns estudos este composto tem mostrado eficiência fotodinâmica quando associado a comprimentos de onda adequados na inativação de várias espécies de micro-organismos, como por exemplo, em *Candida albicans* (58), em *Pythium insidiosum* (75,76), em biofilme multiespécies (82), em isolados clínicos de *Candida spp.* (83), em candidíase oral (84), em espécies clínicas de *E. coli* e *S. aureus* (85), entre outros.

4.5.3 Inativação fotodinâmica em sangue

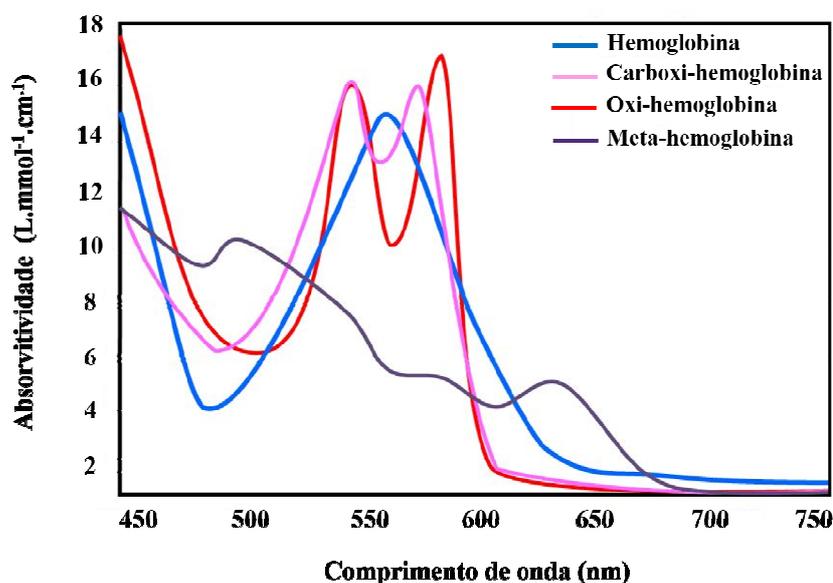
A IFD apresenta algumas especificidades que devem ser consideradas para melhor desempenho da técnica quando aplicada em sangue. Essas especificidades estão relacionadas com o comportamento dos FSs neste meio, considerado rico em moléculas e muito complexo do ponto de vista das interações que podem ocorrer, e também com o processo de irradiação. Tais características serão brevemente apresentadas nesta subseção para, em seguida, algumas pesquisas na área de IFD em sangue serem abordadas.

Quanto ao comportamento dos FSs, quando estas moléculas entram em contato com o sangue, geralmente se ligam às proteínas presentes no plasma. Em especial, essa interação

acontece com a albumina e com as lipoproteínas, sobretudo com as lipoproteínas de baixa intensidade (LDL, do inglês *Low-Density Lipoprotein*). Primeiramente, as moléculas dos FSs ligam-se à albumina, que é a proteína mais abundante no plasma, mas rapidamente se redistribuem para as lipoproteínas, a segunda proteína mais abundante. (65,86). Dessa forma, no sangue, os FSs encontram-se pouco concentrados na forma livre. Outras características a serem consideradas estão relacionadas à estrutura, à carga e à hidrofobicidade dos FSs, que determinam como será a interação com as outras moléculas ao seu redor. E, especificamente no sangue, muitas moléculas do plasma atuam interferindo nessa interação. Com isso, tanto as propriedades farmacocinéticas quanto a biodistribuição do FS podem ser afetadas e influenciar diretamente a resposta durante o processo de IFD. (86)

Quanto ao processo de irradiação, quando a luz entra em contato com o sangue, a mesma pode ser espalhada ou ser absorvida. Sabe-se que uma das moléculas que mais absorve a luz no sangue, na região do visível, é a hemoglobina e suas formas variantes (carboxi-hemoglobina, oxi-hemoglobina e meta-hemoglobina), cujos espectros de absorção são mostrados na Figura 8. (87) Assim, a escolha de um FS deve levar em consideração essa absorção para que não ocorra competição entre o FS e a hemoglobina. Os FSs tais como o Photogem® e o Photodithazine® possuem uma banda de absorção nos comprimentos de onda 630 nm e 660 nm, respectivamente, região na qual a absorção da hemoglobina é menor.

Figura 8 - Espectros de absorção da hemoglobina e das suas formas variantes, carboxi-hemoglobina, oxi-hemoglobina e meta-hemoglobina.



Alguns estudos são encontrados na literatura quanto à descontaminação de sangue *in vitro*, contudo a maioria está relacionada à inativação de vírus ou à inativação de parasitas nos hemocomponentes do sangue, isto é, nos concentrados de eritrócitos, concentrados de plaquetas e no plasma fresco congelado, sendo escassas as pesquisas que estudaram a inativação de micro-organismos, especificamente, de bactérias em sangue total. Portanto, alguns trabalhos relacionados à descontaminação dos componentes sanguíneos utilizando a IFD serão aqui apresentados.

Ben-Hur e colaboradores (1995) estudaram os psoralenos e seus derivados como FSs com ativação por luz UVA para o tratamento de plaquetas. De acordo com os autores, a opção em utilizar estes FSs está relacionada com o potencial de apresentarem alta afinidade pelos ácidos nucleicos, sendo eficaz na inativação de vírus de RNA de cadeia simples. Os parâmetros avaliados para o tratamento dos concentrados de plaquetas foram concentração do FS 50 µg/mL e fluência 38 J/cm². Nestas condições, os pesquisadores obtiveram inativação do vírus da estomatite vesicular superior a 6 log₁₀, sem comprometimento da estrutura e da função das plaquetas. (88)

Além da inativação de vírus nos componentes sanguíneos, estudos descritos na literatura indicam que os patógenos intravasculares envolvidos com doenças tropicais também podem ser inativados com a aplicação da IFD. A inativação do parasita transmitido pelo sangue, *Trypanosoma cruzi*, com a combinação do FS psoraleno e luz UVA foi estudada nos concentrados de plaquetas e no plasma fresco congelado por Gottlieb e colaboradores (1996). O FS foi utilizado na concentração 50 µg/mL e o procedimento de inativação incluiu um flavonoide, composto responsável por manter a integridade plaquetária durante o tratamento. Os resultados mostraram que tanto nos concentrados de plaquetas quanto no plasma fresco congelado houve completa inativação da forma infecciosa de *T. cruzi*. As condições avaliadas mostraram perda total de infectividade do parasita no plasma fresco congelado com 10 minutos de irradiação (4,2 J/cm²), sendo a morte superior a 5,3 log₁₀. Nos concentrados de plaquetas, a perda total de infectividade do parasita também ocorreu com 10 minutos de irradiação (4,2 J/cm²), correspondendo a 4,6 log₁₀ de inativação. (89)

Lustigman e colaboradores (1996) realizaram um estudo que avaliou a ação da IFD na inativação de *Plasmodium falciparum* em concentrados de eritrócitos. Os eritrócitos contaminados com o parasita foram tratados com o FS ftalocianina de silício Pc4, na concentração 2 µM e luz vermelha (>600 nm) na intensidade 25 mW/cm² com diferentes tempos de exposição (0, 5, 10, 20 e 40 minutos). De acordo com os resultados, a redução do *P. falciparum* em concentrados de eritrócitos foi de 3,2 log₁₀ quando as amostras foram

irradiadas por 40 minutos, o maior tempo de exposição, correspondente à fluência 60 J/cm^2 . Como foi observada hemólise nos eritrócitos, os pesquisadores consideraram utilizar um hematócrito mais alto em novas amostras de concentrados de eritrócitos avaliadas, e neste caso, a resposta de hemólise foi consideravelmente menor. (90)

No intuito de reduzir os danos causados aos eritrócitos, Ben-Hur e colaboradores (1999) estudaram o uso da ftalocianina de silício Pc4 em formulação com lipossomas, que reduzem sua ligação com os eritrócitos. O estudo propôs inativar o vírus da estomatite vesicular na presença de eritrócitos utilizando concentração de $2 \mu\text{M}$ do FS nos lipossomas e fluência 10 J/cm^2 com aplicação de LEDs no comprimento de onda 700 nm . Os resultados mostraram que o aprimoramento da especificidade do FS, ao associá-lo com lipossomas, inativou o vírus em $5,5 \log_{10}$ e minimizou a ligação do FS nos eritrócitos, reduzindo os danos causados nestas células, que apresentaram mínima porcentagem de hemólise, em torno de 1%. Embora estes resultados sejam promissores, os autores afirmaram que a inativação conseguida foi eficaz apenas contra vírus envelopados e quando estudada em pequenos volumes de eritrócitos, e que, para uma aplicação clínica, é necessária a retirada do FS do meio após o tratamento. Além disso, os autores relataram a necessidade de mais estudos para que a funcionalidade dos eritrócitos após a IFD seja garantida. (91)

Outras classes de FSs também foram estudadas com o objetivo de descontaminar o sangue. Uma delas, que possui núcleo fenotiazínico, como por exemplo, o azul de metileno, tem sido utilizado com o objetivo de inativar micro-organismos em componentes sanguíneos, principalmente em plasma. O azul de metileno tem demonstrado ser, particularmente, eficaz na inativação de vírus envelopados, oferecendo baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais no plasma, pois afeta diretamente os ácidos nucleicos dos vírus. Entretanto, para garantir que esse FS seja utilizado na inativação viral em bolsas de plasma, é importante que o tratamento não seja prejudicial aos fatores de coagulação presentes neste componente sanguíneo. (31)

Um dos procedimentos testados para a IFD de unidades individuais de plasma fresco congelado envolveu a irradiação do plasma com luz visível, por 60 minutos, associada a uma concentração de $1 \mu\text{M}$ de azul de metileno. Neste estudo, Mohr e colaboradores (1997) mostraram que esse tempo de irradiação podia ser consideravelmente menor com a utilização de LEDs em comprimento de onda 660 nm . Para isso, avaliaram a inativação dos vírus da hepatite B e hepatite C em bolsas de plasma fresco congelado. A concentração do azul de metileno foi de $1 \mu\text{M}$ e a irradiação foi feita por até 60 minutos. Os resultados indicaram que a infecção viral foi anulada com 15 minutos de irradiação, sendo os LEDs a 660 nm , associados

ao azul de metileno, mais eficientes na eliminação dos vírus. Além disso, os autores observaram que os danos às proteínas plasmáticas foram reduzidos neste protocolo. (92)

No entanto, alguns estudos mostraram que o tratamento com o FS azul de metileno associado à luz para inativar vírus em concentrados de eritrócitos provocou alterações na membrana destas células, indicando toxicidade apesar dos altos níveis de morte viral. (93,94) Wagner e colaboradores (1993) mostraram alterações nos eritrócitos após IFD com azul de metileno nas condições utilizadas para inativar o vírus da estomatite vesicular em $6 \log_{10}$. As alterações observadas foram aumento da hemólise, perda de potássio e diminuição nos níveis de adenosina trifosfato. (94) Como o azul de metileno alterou significativamente as propriedades dos eritrócitos, a IFD foi investigada com outro composto, um derivado do azul de metileno, também na inativação do vírus da estomatite vesicular em concentrados de eritrócitos. Neste estudo, Wagner e colaboradores (1998) utilizaram o azul de dimetilmetileno na concentração $4 \mu\text{mol/L}$, irradiado com luz branca na intensidade 5 mW/cm^2 , com exposição por 45 minutos, que correspondeu à fluência de $13,5 \text{ J/cm}^2$. Os resultados mostraram inativação superior a $4,4 \log_{10}$ do vírus, nas condições avaliadas, e pouco dano foi observado aos eritrócitos, que apresentaram baixa porcentagem de hemólise e mínimas mudanças em sua fragilidade osmótica. Assim, os autores afirmam que o azul de dimetilmetileno mostrou ser um FS promissor na IFD de vírus presentes em eritrócitos. (95)

Além dos FSs fenotiazínicos, algumas porfirinas também foram estudadas e podem ser aplicadas na inativação de micro-organismos, *in vitro*, presentes em meios aquosos ou em componentes sanguíneos. Em relação às porfirinas, um dos primeiros estudos que avaliou a sua eficácia na inativação de micro-organismos em plasma e em outros líquidos foi realizado por Casteel e colaboradores (2004). Nesta pesquisa, o efeito de porfirinas sintéticas foi analisado sobre o vírus da hepatite A e sobre o bacteriófago MS2 em plasma humano. As porfirinas foram expostas à luz ultravioleta, no comprimento de onda 365 nm, e irradiadas por 90 minutos, tempo correspondente à fluência $4,3 \text{ J/cm}^2$. Como resultado, foram obtidos 3 a $4 \log_{10}$ de inativação em ambos os vírus, mostrando que o processo de inativação com uso de porfirinas sintéticas fotoativadas pode ser uma abordagem efetiva e relativamente segura na inativação de vírus não envelopados em meios aquosos. (14)

Quanto à inativação de bactérias na presença de componentes sanguíneos, Spesia e colaboradores (2010) estudaram duas bactérias, *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Streptococcus mitis* (Gram-positiva), em diferentes meios contendo derivados de sangue. Para isso, utilizaram como FS ftalocianina catiônica modificada nas concentrações $2 \mu\text{M}$ para *E. coli* e $1 \mu\text{M}$ para *S. mitis*. As bactérias foram expostas à luz visível por diferentes intervalos de

tempo (5, 10 e 30 minutos). A intensidade de irradiação foi de 30 mW/cm². Os experimentos avaliaram a inativação das bactérias em solução salina, em eritrócitos e em plasma. Os resultados mostraram que a inativação das bactérias em solução salina foi de 4 log₁₀ UFC/mL para *E. coli* e de 3,5 log₁₀ UFC/mL para *S. mitis*, com 30 minutos de irradiação. Na presença dos eritrócitos, a inativação foi de 1,7 log₁₀ UFC/mL para *E. coli* e 3 log₁₀ UFC/mL para *S. mitis*, nas mesmas condições do experimento anterior e, na presença de plasma a inativação foi de 0,5 log₁₀ UFC/mL para ambas, *E. coli* e *S. mitis*. O dano aos eritrócitos foi avaliado pelo ensaio de hemólise, que indicou cerca de 75% de hemólise com 10 minutos de irradiação na presença de 2 µM do FS e 90% de hemólise com 30 minutos de irradiação na mesma concentração do FS. Para evitar o dano aos eritrócitos, os autores propuseram novos ensaios utilizando íon azida e os resultados indicaram redução de 75% para 15% de hemólise com 10 minutos de irradiação. (96)

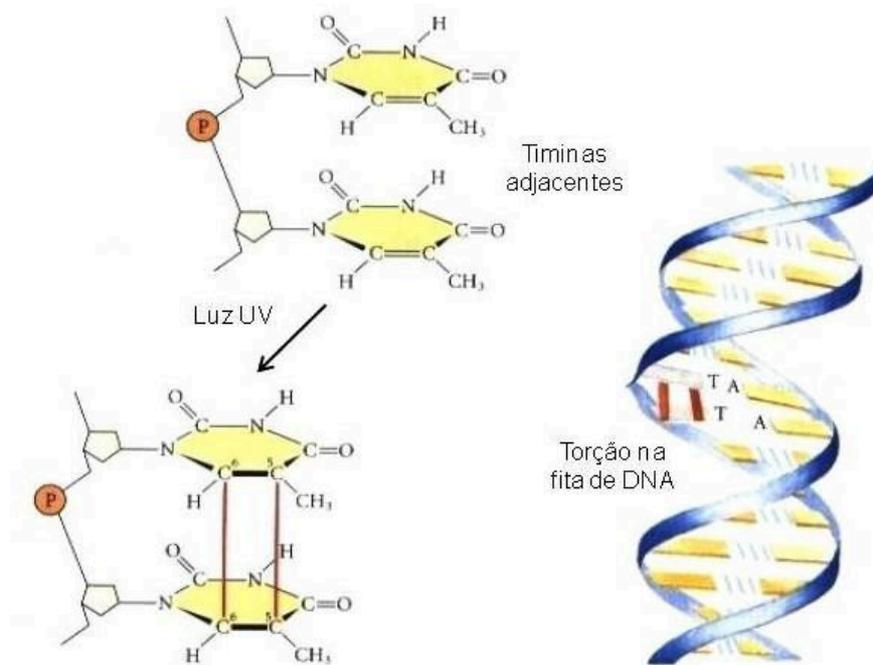
Apesar de este estudo mostrar um bom resultado de inativação da bactéria Gram-positiva na presença dos eritrócitos, ainda assim estas células sofreram danos, mesmo na presença do íon azida. Além disso, é importante enfatizar que o FS utilizado na IFD destas bactérias foi estruturalmente modificado para garantir maior afinidade a elas e, portanto, não pode ser utilizado na clínica, nem ser aplicado em bolsas de concentrados de eritrócitos. Por esse motivo, e por serem escassos os estudos de IFD em bactérias presentes em sangue total e nos hemocomponentes, a presente pesquisa buscou estudar a inativação de uma bactéria Gram-positiva, frequentemente relacionada com casos de bacteremia e infecções sanguíneas, em sangue total e também nos hemocomponentes separados, eritrócitos e plasma rico em plaquetas, utilizando dois FS aprovados para estudos clínicos com IFD.

4.6 Radiação ultravioleta

A radiação ultravioleta (UV) é a fração do espectro eletromagnético que abrange os comprimentos de onda abaixo da luz visível, variando de 100 a 400 nm. Essa radiação é ainda dividida em quatro diferentes áreas espectrais, incluindo UV de 100 a 200 nm, UVC de 200 a 280 nm, UVB de 280 a 315 nm e UVA de 315 a 400 nm. (97) Dentre todas essas radiações, a radiação UVC é considerada a faixa germicida ótima para inativação de micro-organismos, pois é absorvida pelo material genético das bactérias, fungos e vírus, tornando-os incapazes de se replicar e de causar doenças. (98) Assim, os efeitos biológicos produzidos pela radiação UV dependem do comprimento de onda, da intensidade e da duração da iluminação.

O mecanismo de ação da radiação UV é bem conhecido na literatura. Quando os micro-organismos são expostos à radiação inicia-se um processo de destruição devido aos danos causados ao material genético das células, principal causa da morte celular. O material genético é constituído pelos ácidos nucleicos DNA/RNA, que são formados por nucleotídeos. Os nucleotídeos, por sua vez, são constituídos por um radical fosfato, por um açúcar (pentose: ribose ou desoxirribose) e por uma base nitrogenada (purinas: adenina e guanina; pirimidinas: timina, citosina e uracila). Assim, o processo de inativação ocorre quando a radiação UV penetra através das células e é absorvida pelas purinas e pirimidinas no DNA/RNA, que entram em um estado mais reativo, formando dímeros de pirimidina. O principal efeito mutagênico da radiação UV é a dimerização da timina (Figura 9), que corresponde à ligação de duas timinas próximas de uma mesma fita de DNA/RNA, prejudicando a estrutura do material genético. Esse rearranjo na informação genética gera uma nova configuração, que não é reconhecida pelas células e bloqueia a replicação do DNA/RNA. A consequência desse processo constitui em morte celular, sendo este o dano fotoquímico mais frequente que interfere na capacidade de replicação dos micro-organismos após o contato com a radiação UV. (99)

Figura 9 - Ilustração da dimerização da timina e do efeito mutagênico da radiação UV no material genético.



Equipamentos que utilizam a radiação UV são considerados tecnologias e alguns deles já estão aprovados por órgãos de saúde em diversos países. Esses equipamentos ou dispositivos têm sido utilizados no controle de muitas espécies de micro-organismos nas mais diversas áreas de aplicação, como por exemplo, na desinfecção de água, na esterilização de ambientes e descontaminação do ar, na esterilização de salas hospitalares, centros cirúrgicos, clínicas e laboratórios, na produção de medicamentos, cosméticos e alimentos, e na descontaminação de superfícies em geral. (100–104)

Além dessas aplicações, a radiação UV pode ser considerada outra técnica que pode ser empregada na descontaminação de sangue e de seus componentes. Foi amplamente utilizada na prática médica nas décadas de 1940 e 1950 para tratar várias doenças graves de origem infecciosa, tais como tuberculose, pneumonia e sepse. (97,105)

Experimentos utilizando a radiação UV em sangue foram realizados por Knott em 1948. O pesquisador realizou uma série de experimentos usando a radiação UV em sangue extraído de cães que haviam sido infectados intravenosamente com *S. aureus* e com *Streptococcus* hemolítico. Após os experimentos, o sangue tratado foi reinfundido nos animais e o pesquisador descobriu que não era necessário fornecer uma exposição ao sangue suficiente para matar todas as bactérias. Além disso, afirmou que não era necessário expor todo o volume de sangue contaminado ao procedimento, uma vez que a quantidade ideal de sangue a ser irradiada foi estabelecida em 5 a 7% do volume sanguíneo ou, aproximadamente, 3,5 mL por kg do peso corporal. Knott observou que ultrapassar esse volume de sangue irradiado levou à perda dos benefícios da terapia. Como resultado, todos os cães tratados foram recuperados da infecção sanguínea. (106)

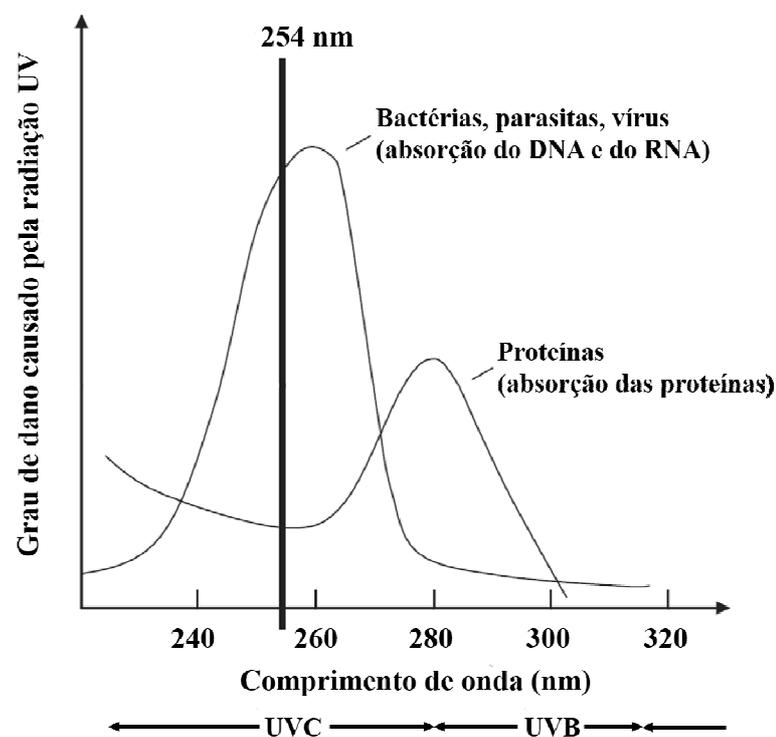
Levashenko (1999) afirmou que o efeito terapêutico mais provável da radiação UV consiste na estimulação da atividade funcional da formação dos elementos do sangue, principalmente relacionado aos eritrócitos. Assim, apenas a irradiação das células sanguíneas em vez da irradiação do sangue total é capaz de fornecer um efeito terapêutico. Ensaio clínicos experimentais mostraram que o uso da radiação UV promove este efeito no intervalo de dose de 0,6 a 3,0 J/cm², em comprimento de onda entre 250 a 400 nm e em uma intensidade que varia de 1 a 5 mW/cm². Nestas condições, segundo o autor, a radiação UV não induziu transformação fotoquímica nos componentes sanguíneos. (105)

Mesmo após as descobertas destas pesquisas, a investigação sobre o uso da radiação UV para o controle de infecções declinou logo após o surgimento dos antibióticos, época que coincidiu com o início dos estudos relacionados à UV e, mais recentemente, alguns autores tem chamado a técnica de “a cura que o tempo esqueceu”. (97) Assim, as pesquisas com

radiação UV ficaram esquecidas e, desde então, utilizar a radiação UV para controlar infecções ou para aplicação alternativa aos tratamentos convencionais de infecções tem sido um fato rejeitado por muitas pessoas, principalmente, pela comunidade médica. E, a maior dificuldade em tornar a técnica possível de ser utilizada vem das incertezas quanto à segurança do seu mecanismo de ação e da ideia de que a radiação UV só pode ser usada na esterilização de instrumentos, água, ar.

O grande problema relacionado ao fato de tratar componentes sanguíneos com a radiação UV é que tanto as células quanto as proteínas e outras substâncias presentes no sangue também podem ser danificadas pela aplicação desta radiação. Existe, no entanto, um intervalo de comprimento de onda no qual os micro-organismos podem ser inativados sem comprometer ou danificar os componentes biologicamente ativos presentes no sangue (Figura 10). Portanto, os danos ocasionados aos agentes patogênicos dependem do comprimento de onda da radiação UV empregada e, especificamente, o comprimento de onda 254 nm danifica mais severamente as bactérias, fungos e vírus do que as proteínas presentes no plasma, por exemplo. (107,108)

Figura 10 - Desenho esquemático do grau de dano causado pela irradiação UV, nos diferentes comprimentos de onda, aos agentes patogênicos (bactérias, parasitas, vírus) e às proteínas.



Nesse sentido, Caillet-Fauquet e colaboradores (2004) investigaram um novo método na inativação de algumas espécies de vírus (vírus da encefalomielite, vírus do herpes bovino 1) e de bactérias (*Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*) presentes em plasma. Os pesquisadores desenvolveram um equipamento de irradiação UVC em fluxo contínuo com lâmpada de mercúrio de baixa pressão, no comprimento de onda 254 nm. A irradiação ocorreu a uma taxa de fluxo de 300 a 600 mL por minuto e as fluências variaram de 120 a 240 J/m². Os experimentos demonstraram que nas condições de fluxo a 350 mL/min. e fluência de 200 J/m² a sobrevivência dos vírus foi reduzida em cerca de 5 log₁₀ e, nestas condições, as atividades de vários fatores presentes no plasma mantiveram-se preservadas, sem necessidade de adicionar qualquer produto de preservação. Quanto às bactérias, um fator de redução acima de 5 log₁₀ UFC/mL foi obtido com o dobro da fluência máxima (480 J/m²). Além destes resultados, os autores afirmaram que outros pesquisadores utilizaram o equipamento de irradiação UVC em fluxo contínuo e também obtiveram sucesso na inativação do vírus da hepatite A na presença de soluções preparadas com protrombina. Neste caso, a sobrevivência do vírus foi diminuída em mais de 4 log₁₀ na fluência 270 J/m². (109)

Outra pesquisa realizada com irradiação UVC em vírus foi investigada por Wang e colaboradores (2004), cujo objetivo foi inativar vírus em plasma e recuperar uma proteína teste (Alpha1-PI) após o tratamento com UVC em reator de fluxo espiral. Os vírus estudados foram o parvovírus porcino, adenovírus tipo 5 e reovírus tipo 3, e todos os experimentos foram realizados em um reator contendo lâmpada UV de mercúrio de baixa pressão no comprimento de onda 254 nm. Após o tratamento com a menor fluência (0,009 J/cm²), 99% da atividade da proteína foi recuperada, sendo que com a máxima fluência (0,431 J/cm²) houve recuperação de 87%. Quanto à inativação dos vírus, redução de 4 log₁₀ foi alcançada com as fluências 0,009 J/cm² para o parvovírus porcino, 0,216 J/cm² para o adenovírus tipo 5 e 0,074 J/cm² para o reovírus tipo 3. Portanto, o estudo demonstrou eficácia do equipamento na inativação de vírus, com dano mínimo na proteína teste analisada. (110)

Após muito tempo da realização destas pesquisas, estudos mais recentes sugerem que a radiação UV, em especial a UVC, deve ser investigada como uma abordagem alternativa aos métodos atuais utilizados para tratar infecções localizadas, sobretudo aquelas causadas por micro-organismos multirresistentes, já que estes também são sensíveis à radiação UVC. Dai e colaboradores (2012) sugerem que, com doses apropriadas, a radiação UVC pode inativar seletivamente os micro-organismos, além de preservar a viabilidade das células, e enfatizam que a técnica deve ser utilizada de forma que os efeitos colaterais sejam minimizados. No entanto, no caso da radiação UVC produzir danos no DNA das células de

mamíferos, os pesquisadores afirmam que estes danos podem ser rapidamente reparados pelas enzimas de reparo existentes no DNA das células hospedeiras. (111)

Nessa mesma direção, Wu e colaboradores (2016), autores de um artigo de revisão sobre o tema, propõem que a radiação UV empregada na descontaminação do sangue seja reconsiderada e novamente pesquisada no intuito de recomendá-la como uma possível técnica para o tratamento de infecções sistêmicas causadas por micro-organismos resistentes a multidrogas, entre eles, espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Além disso, os autores sugerem que os pacientes com risco de morte por sepse sejam candidatos à aplicação da técnica. (97)

Portanto, pesquisas adicionais são necessárias para que as relações entre o mecanismo de ação da radiação UVC no sangue e os resultados de inativação dos micro-organismos sejam avaliadas, para que se comprove se a técnica pode desempenhar, ou não, um papel importante na terapia médica relacionada ao tratamento de infecções. Neste sentido, esta pesquisa buscou estudar, de um modo ainda rudimentar, o início desse processo: a inativação de uma bactéria Gram-positiva em sangue pela radiação UVC e seus efeitos em eritrócitos e em plaquetas presentes em plasma sanguíneo.

5 CAPÍTULO 1 - DESCONTAMINAÇÃO FOTODINÂMICA DO SANGUE

Neste capítulo são apresentados os objetivos específicos, bem como os resultados, discussões e conclusões parciais relacionados aos experimentos de inativação fotodinâmica de *S. aureus* em sangue total e nos hemocomponentes.

5.1 Objetivos Específicos

Avaliar a eficácia *in vitro* da IFD utilizando Photogem® e Photodithazine® sobre *S. aureus* em PBS, em sangue total, em eritrócitos e em plasma rico em plaquetas.

Avaliar os constituintes do sangue após a IFD por meio de ensaios de hemólise, análise quantitativa (hemogramas), análise qualitativa (esfregaços sanguíneos) e ensaios de viabilidade celular (citometria de fluxo).

Analisar a interação do Photogem® com o sangue total e verificar o local de interação do FS nos eritrócitos e no plasma rico em plaquetas.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Amostras de sangue

Amostras de sangue humano foram doadas, voluntariamente, pela própria pesquisadora. As coletas foram realizadas em tubos de coleta de sangue de tampa roxa (BD Vacutainer®) contendo anticoagulante EDTA K2 7,2 mg jateado na parede interna do tubo. O EDTA K2 é o anticoagulante mais recomendado para uso em análises hematológicas por ser o melhor em preservar a morfologia celular e as características físico-químicas das células do sangue, evitando alterações nas amostras extraídas. Imediatamente após a coleta, os tubos eram homogeneizados, cuidadosamente, por inversão de 5 a 8 vezes para evitar a hemólise e a coagulação do sangue.

5.2.2 Cultivo do micro-organismo

Os experimentos foram realizados com o micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), bactéria Gram-positiva. A cepa foi mantida em caldo tripton de soja (TSB, do inglês *Tryptic Soy Broth*) com 20% de glicerol e foi armazenada em criotubos congelados a -4°C. Para o preparo do inóculo, 1 mL da bactéria mantida em congelador foi transferido para tubo cônico tipo Falcon esterilizado contendo 9 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e, após homogeneização da amostra, o tubo foi mantido sob agitação por 15 horas à 37°C. Após esse tempo, o tubo contendo a bactéria foi lavado 2 vezes com solução tampão fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*) por meio de centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos. Após o procedimento, diluições em PBS foram realizadas e a densidade da suspensão foi medida no espectrofotômetro (Cary® 50 Bio UV-Vis, Varian, Austrália) no comprimento de onda 600 nm para obtenção do inóculo a uma concentração de 10^7 a 10^8 UFC/mL, aproximadamente.

5.2.3 Fotosensibilizadores

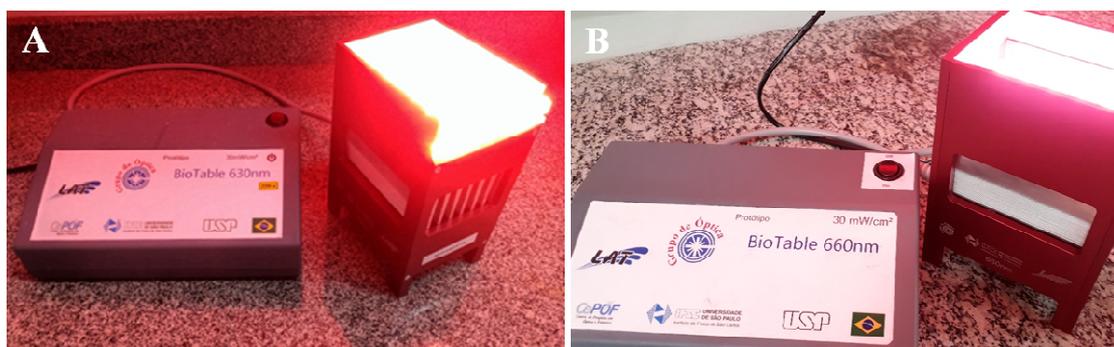
Os FSs utilizados foram o Photogem® e o Photodithazine®. Alíquotas com 5 mg do Photogem® em pó foram fracionadas em balança analítica e armazenadas em microtubos de centrífuga cônicos à temperatura de 4°C. A solução estoque foi preparada diluindo-se os 5 mg

do Photogem® em 1 mL de solução salina 0,9% NaCl, com concentração de 5 mg/mL, igual à concentração da solução estoque do Photodithazine®, que já vem preparada. A partir destas soluções estoque, e imediatamente antes do início dos experimentos, foram realizadas diluições em solução salina 0,9% NaCl para obtenção das concentrações desejadas. As soluções dos FSs foram preparadas em dupla concentração, pois ao serem adicionadas ao inóculo, as concentrações foram reduzidas pela metade, obtendo-se as concentrações finais de 25 e 50 µg/mL. Os tubos contendo as soluções de FS foram envolvidos em papel alumínio para proteger os FSs da luz durante a realização dos experimentos. O tempo de incubação dos FSs com as amostras, no escuro, antes da irradiação, foi de 30 minutos à temperatura de 37°C.

5.2.4 Fonte de luz

Dois equipamentos, denominados *Biotable* (Figura 11), foram utilizados para a irradiação das amostras e ativação dos FSs. Cada equipamento é composto por 24 diodos emissores de luz (LEDs, do inglês *Light Emitting Diodes*) que possibilitam a irradiação simultânea de 24 amostras. Ambos foram desenvolvidos pelo Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT) do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo (IFSC/USP). Para os experimentos com Photogem® foi utilizada a *Biotable* com emissão em 630 nm, irradiância de 30 mW/cm² e fluências de 10, 15 e 30 J/cm². Para os experimentos realizados com Photodithazine® foi utilizada outra *Biotable*, com emissão em 660 nm, irradiância de 30 mW/cm² e fluências de 10, 15 e 30 J/cm².

Figura 11 - Foto ilustrativa dos equipamentos utilizados na irradiação das amostras. (A) *Biotable* no comprimento de onda 630 nm. (B) *Biotable* no comprimento de onda 660 nm.



Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.5 Determinação da variação de temperatura nas amostras sanguíneas

Com a possibilidade de ocorrer aumento na temperatura durante a irradiação das amostras, este parâmetro foi medido para a *Biotable* no comprimento de onda 630 nm. A variação na temperatura foi determinada por um multímetro, na função termômetro. Aliquotas de 400 µL de sangue total foram colocadas em uma placa multipoços com 24 poços e irradiadas por um período de 60 minutos, com aferição da temperatura a cada 5 minutos.

5.2.6 Grupos de estudo e desenho experimental

Quatro grupos experimentais foram estudados e avaliados: controle L(-)FS(-), controle da luz L(+),FS(-), controle do fotossensibilizador L(-)FS(+), e inativação fotodinâmica L(+),FS(+), em que (-) representa ausência de luz e/ou FS e (+) representa presença de luz e/ou FS. Os experimentos foram realizados em placas multipoços com 24 poços, nos quais foram adicionados 200 µL do inóculo e 200 µL da solução do FS para os grupos controle do FS e IFD, e 200 µL do inóculo e 200 µL de solução salina 0,9% NaCl para os grupos controle e controle da luz. Assim, cada poço apresentou volume final de 400 µL. As amostras permaneceram nas placas por 30 minutos, no escuro, à 37°C e, após este período de incubação, foram irradiadas nas fluências de escolha. Os protocolos experimentais utilizados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros avaliados na inativação fotodinâmica de *S. aureus* em PBS, em sangue total e nos hemocomponentes.

| Legenda | FS | Concentração do FS | Intensidade | Tempo de irradiação | Fluência |
|----------------------------------|-----------------|--------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|
| L ₁₀ FS ₂₅ | Photogem® | 25 µg/mL | 30 mW/cm ² | 333 s | 10 J/cm ² |
| L ₁₀ FS ₅₀ | | 50 µg/mL | | | |
| L ₁₅ FS ₂₅ | | 25 µg/mL | | 500 s | 15 J/cm ² |
| L ₁₅ FS ₅₀ | | 50 µg/mL | | | |
| L ₃₀ FS ₂₅ | | 25 µg/mL | | 1000 s | 30 J/cm ² |
| L ₃₀ FS ₅₀ | | 50 µg/mL | | | |
| L ₁₀ FS ₂₅ | Photodithazine® | 25 µg/mL | 30 mW/cm ² | 333 s | 10 J/cm ² |
| L ₁₀ FS ₅₀ | | 50 µg/mL | | | |
| L ₁₅ FS ₂₅ | | 25 µg/mL | | 500 s | 15 J/cm ² |
| L ₁₅ FS ₅₀ | | 50 µg/mL | | | |
| L ₃₀ FS ₂₅ | | 25 µg/mL | | 1000 s | 30 J/cm ² |
| L ₃₀ FS ₅₀ | | 50 µg/mL | | | |

Fonte: Elaborada pela autora.

Para simular as mesmas condições, o grupo controle, que não foi exposto à luz e nem ao FS, também foi colocado nos poços da placa multipoços pelo mesmo tempo utilizado na incubação e irradiação dos outros grupos. Os experimentos foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes.

5.2.7 IFD de *S. aureus* em PBS, em sangue total e em hemocomponentes

Para os experimentos de IFD do micro-organismo *S. aureus* em PBS foi seguido o desenho experimental descrito acima. Após a irradiação, 100 µL das amostras foram aspirados do volume final de cada poço e transferidos para microtubos de centrifuga contendo 900 µL de PBS esterilizado, seguido de diluições decimais até 10^{-5} . Placas de Petri contendo ágar BHI foram divididas em seis partes iguais, sendo que cada parte recebeu 17 µL de cada diluição, plaqueados pelo método de espalhamento. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas para posterior contagem das UFC/mL.

Para os experimentos de IFD de *S. aureus* em sangue total foi seguido o mesmo desenho experimental descrito nos itens 5.2.6 e 5.2.7. A diferença é que nestes experimentos o micro-organismo foi ressuspendido em sangue total ao invés de ser em PBS. Já para os experimentos de IFD de *S. aureus* nos hemocomponentes, o sangue total foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos para a separação do sangue em eritrócitos e em plasma rico em plaquetas e, após a centrifugação, cada hemocomponente foi contaminado com *S. aureus*, sendo aplicado o mesmo desenho experimental previamente descrito.

5.2.8 Ensaio de hemólise

Para os ensaios de hemólise em eritrócitos isolados, amostras de sangue total coletadas foram transferidas para tubo cônico tipo Falcon e centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos para a remoção do plasma rico em plaquetas e da camada de leucócitos. O tubo contendo apenas eritrócitos foi lavado 3 vezes com PBS por meio de centrifugação na mesma rotação citada acima. Para avaliar a hemólise, os eritrócitos foram ressuspendidos em solução salina 0,9% NaCl para serem utilizados nos experimentos de IFD conforme descrito nos itens anteriores, seguindo os mesmos parâmetros. Ao final dos experimentos, as amostras ficaram sob refrigeração no escuro a 4°C por 24 horas e, após este período, foram centrifugadas a 3000 rpm

por 5 minutos e 50 μL do sobrenadante foram diluídos em 10 mL de água destilada. (96) A hemoglobina presente nos eritrócitos foi determinada pela medida de absorvância em 413 nm, comprimento de onda correspondente à banda de Soret da hemoglobina. Os resultados foram expressos em porcentagem de hemólise com base na absorvância obtida a partir de uma amostra totalmente lisada em água destilada. Assim, para o cálculo da porcentagem de hemólise, o valor da absorvância obtido para cada condição de estudo foi dividido pelo valor da absorvância da amostra sob condição de hemólise total e multiplicado por 100%. Além das medidas de absorvância realizadas nos sobrenadantes dos tubos contendo os eritrócitos isolados, foram também realizadas medidas de absorvância nos sobrenadantes dos tubos contendo sangue total, após os experimentos de IFD, para avaliar a porcentagem de hemólise dos eritrócitos na presença do plasma.

5.2.9 Análise quantitativa e qualitativa do sangue total

Para analisar quantitativamente e qualitativamente o sangue total após a IFD foram realizados experimentos seguindo o desenho experimental descrito no item 5.2.6. Para esses experimentos, o FS de escolha foi o Photogem® na concentração 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e a fluência foi de 15 J/cm^2 . Após os experimentos, as amostras sanguíneas dos grupos $\text{L}_{(-)}\text{FS}_{(-)}$, $\text{L}_{(+)}\text{FS}_{(-)}$, $\text{L}_{(-)}\text{FS}_{(+)}$ e $\text{L}_{(+)}\text{FS}_{(+)}$ foram levadas para um contador automático eletrônico de células sanguíneas do Setor de Hematologia do Laboratório Maricondi (São Carlos/SP – colaboração estabelecida com o gestor de laboratórios Márcio Lopes Bandoni) para a avaliação quantitativa das células por meio de hemogramas. Os resultados obtidos nos hemogramas foram comparados aos valores de referência das células e dos constituintes sanguíneos para mulheres. Para a avaliação qualitativa e análise morfológica das células (eritrócitos e leucócitos), lâminas de esfregaços sanguíneos corados com May Grünwald-Giemsa foram confeccionadas também no Setor de Hematologia do Laboratório Maricondi (São Carlos/SP). As lâminas foram visualizadas em microscopia óptica comum e os resultados foram avaliados pelo hematologista responsável do laboratório.

5.2.10 Análise da interação entre Photogem® e sangue

Este estudo foi conduzido para analisar a interação do Photogem® com o sangue através da espectroscopia de absorção e da microscopia confocal por fluorescência. Para isso, 200 μL

de sangue total foram transferidos para microtubos de centrifuga e alíquotas da solução estoque do FS (5 mg/mL) foram adicionadas aos microtubos para obtenção das seguintes concentrações: 6,25; 12,5; 25; 31,25; 37,5; 50; 62,5 e 125 µg/mL. Após 30 minutos de incubação a 37°C, 10 µL de cada amostra foram diluídos em 4 mL de solução salina 0,9% NaCl para a realização das medidas no espectrofotômetro. Após a retirada dos 10 µL, as amostras de sangue com as diferentes concentrações do FS foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos para separação dos hemocomponentes em eritrócitos e em plasma rico em plaquetas. Novas medidas de absorção foram realizadas em cada hemocomponente seguindo o mesmo padrão de diluição.

Para melhor entender a interação do Photogem® com os eritrócitos, 20 µL de sangue total foram diluídos em 3 mL de solução salina 0,9% NaCl e, nesta solução foi adicionado FS na concentração 50 µg/mL. Após 30 minutos de incubação, a amostra foi analisada em um microscópio confocal (LSM 780 Carl Zeiss, Alemanha) e as imagens foram adquiridas usando laser de diodo que emite a 405 nm para excitação. Duas modalidades diferentes de imagens foram obtidas, na primeira, o sinal de fluorescência foi coletado em um canal de 600 a 700 nm, correspondendo à fluorescência do Photogem® (cor vermelha) e sobreposta à imagem de luz transmitida. A segunda modalidade de imagem foi a espectral onde o sinal de fluorescência foi dividido em 32 canais variando de 420 a 680 nm com resolução de 8 nm.

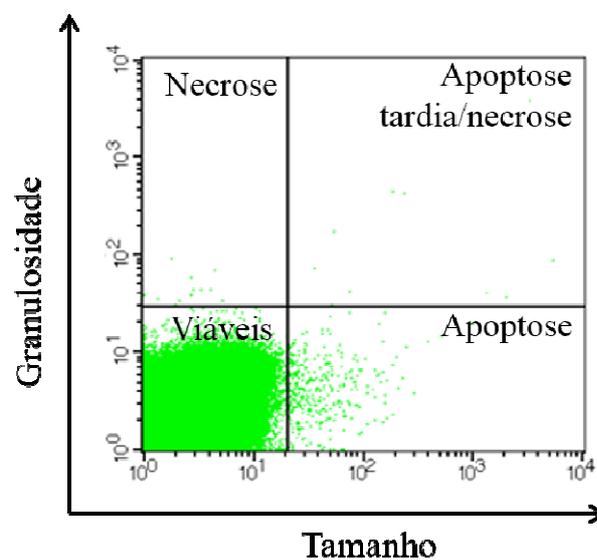
5.2.11 Ensaios de viabilidade celular

Para determinar os índices de viabilidade dos eritrócitos e das plaquetas presentes no plasma sanguíneo após a IFD com Photogem® foram realizados experimentos no Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da UNESP de Botucatu (colaboração estabelecida com a Prof^a Dr^a. Elenice Deffune). Para isso, foram utilizados dois reagentes: Anexina V-FITC e iodeto de propídeo (Kit BD Pharmingen®). A marcação das células seguiu especificações do fabricante, com leitura no equipamento citômetro de fluxo FACSCalibur BD® e análise em software PAINT-A-GATE da BD®. A Anexina V é uma proteína Ca² dependente que tem elevada afinidade por fosfatidilserinas, que são fosfolipídios internos da membrana expressos somente nos casos de apoptose. O iodeto de propídeo (PI) é utilizado para diferenciar células intactas das não intactas. As células intactas excluem o PI enquanto as células mortas são permeáveis ao reagente.

A leitura dos resultados pelo software CellQuest da BD® foi gerada em *dot plot*, cuja distribuição das células analisadas é feita por quadrante (Figura 12). Assim, as células viáveis

que não expressam Anexina V nem PI são identificadas no quadrante inferior esquerdo. As células em apoptose expressam Anexina V, mas não expressam PI e são identificadas no quadrante inferior direito. Já as células em apoptose tardia que começam a coexpressar o PI são identificadas no quadrante superior direito, enquanto as células em necrose que expressam Anexina V e PI são identificadas no quadrante superior esquerdo.

Figura 12 - Representação esquemática da análise da distribuição das células marcadas com Anexina V e iodeto de propídeo pelos quadrantes do *dot plot* gerado na citometria de fluxo.



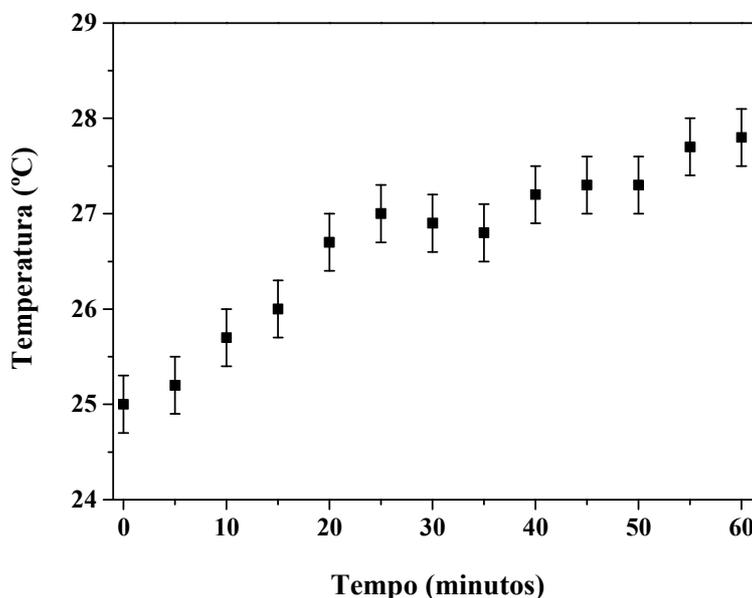
Fonte: Elaborada pela autora.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Determinação da variação de temperatura nas amostras de sangue

Antes de iniciar os experimentos de IFD e para excluir o efeito fototérmico sobre o sangue e, conseqüentemente sobre a inativação do *S. aureus*, medidas de temperatura foram realizadas em amostras de sangue total por um intervalo de 60 minutos, com aferição a cada 5 minutos. É possível observar na Figura 13 que a variação da temperatura foi pequena durante a irradiação do sangue total com a *Biotable* no comprimento de onda 630 nm. A temperatura variou de $25,0 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ a $27,8 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, sendo que a temperatura máxima observada manteve-se distante dos valores elevados que poderiam causar algum dano térmico aos componentes sanguíneos.

Figura 13 - Medida de temperatura do sangue total durante irradiação no comprimento de onda 630 nm em função do tempo. Intensidade da irradiação: 30 mW/cm^2 . Os valores expressam a média e o desvio padrão.



Fonte: Elaborada pela autora.

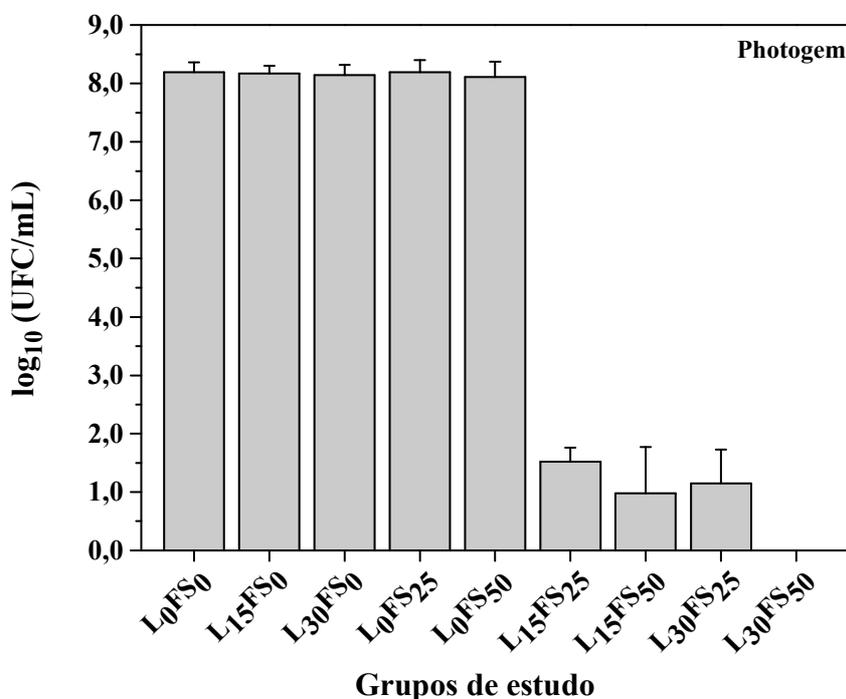
É conhecido na literatura que valores altos de temperatura, por volta de 40°C , podem causar desnaturação de proteínas, colapso da membrana citoplasmática e até lise celular. (112,113) No entanto, em nenhum momento da irradiação das amostras sanguíneas o valor da

temperatura alcançou 37°C, temperatura na qual as amostras se encontravam durante o período de incubação com os FSs. Portanto, este resultado indica que a temperatura não foi um fator que influenciou nos demais resultados considerando que o sangue não alcançou a faixa de temperatura que pode causar danos aos eritrócitos durante a realização dos experimentos de IFD.

5.3.2 IFD de *S. aureus* em PBS, em sangue total e análise da hemólise

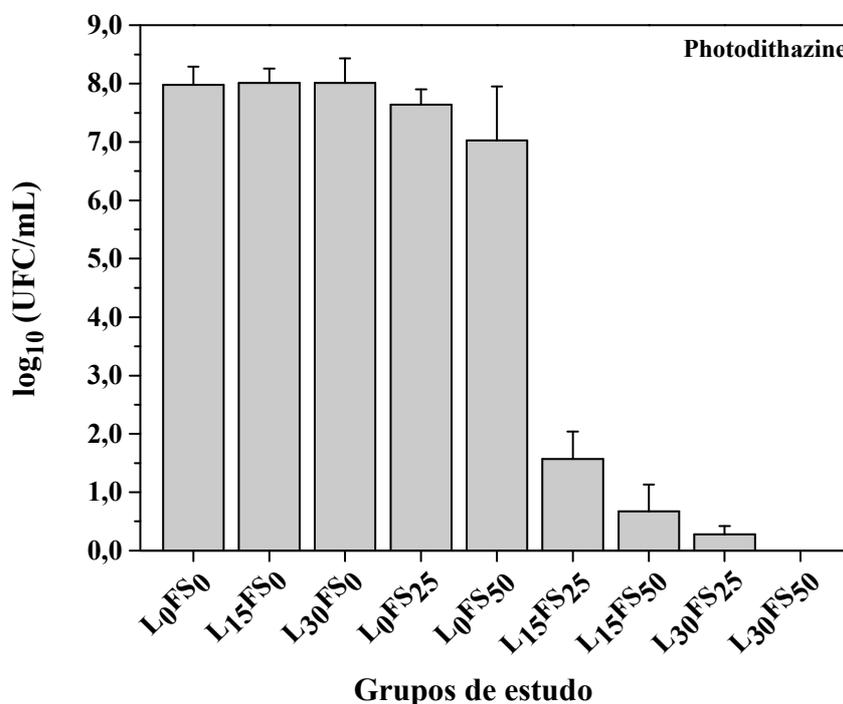
Para avaliar a eficácia *in vitro* da IFD utilizando os FSs Photogem® e Photodithazine® sobre a bactéria Gram-positiva *S. aureus*, experimentos com o micro-organismo foram realizados em PBS e os resultados são mostrados nas Figuras 14 e 15.

Figura 14 - Sobrevivência de *S. aureus* em PBS após IFD com Photogem® em função das fluências $L = 0, 15$ e 30 J/cm^2 (630 nm), e das concentrações de FS = 0, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Os valores expressam a média e o desvio padrão.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 15 - Sobrevivência de *S. aureus* em PBS após IFD com Photodithazine® em função das fluências L = 0, 15 e 30 J/cm² (660 nm), e das concentrações de FS = 0, 25 e 50 µg/mL. Os valores expressam a média e o desvio padrão.



Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com os gráficos, observa-se redução superior a 6 log₁₀ UFC/mL de *S. aureus* nas condições avaliadas com os dois FSs nos grupos IFD, e redução total no grupo IFD com fluência 30 J/cm² e concentração 50 µg/mL para os dois FSs. Tais resultados mostram que tanto o Photogem® quanto o Photodithazine®, quando associados à luz, em comprimentos de onda adequados, foram capazes de produzir efeitos deletérios em *S. aureus* nas condições estudadas. Desse modo, a técnica foi eficaz na inativação *in vitro* do micro-organismo quando mesmo estava em PBS. Além disso, não foi observada toxicidade do Photogem® e do Photodithazine® nas concentrações testadas, quando avaliados no escuro, nem toxicidade da luz nos comprimentos de onda 630 nm e 660 nm nas fluências testadas, sobre *S. aureus*.

Com base nos gráficos mostrados acima, o Photodithazine® apresentou melhor resposta na inativação do *S. aureus*, o que pode estar relacionado ao fato deste FS apresentar máxima absorção em comprimento de onda maior do que o Photogem®. Essa característica é vantajosa uma vez que a luz consegue penetrar mais profundamente no meio em comprimentos de onda maiores. Aliado a isso, moléculas anfífilas são conhecidas por

interagir fortemente com as membranas biológicas, o que geralmente promove uma otimização da IFD. O Photodithazine® possui caráter anfifílico e em meio biológico apresenta carga negativa, assim como as porfirinas. (114) No entanto, o coeficiente de extinção molar do Photodithazine® ($3,82 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) é 30 vezes maior do que o do Photogem® ($1170 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), possuindo assim maior absorvidade. (115)

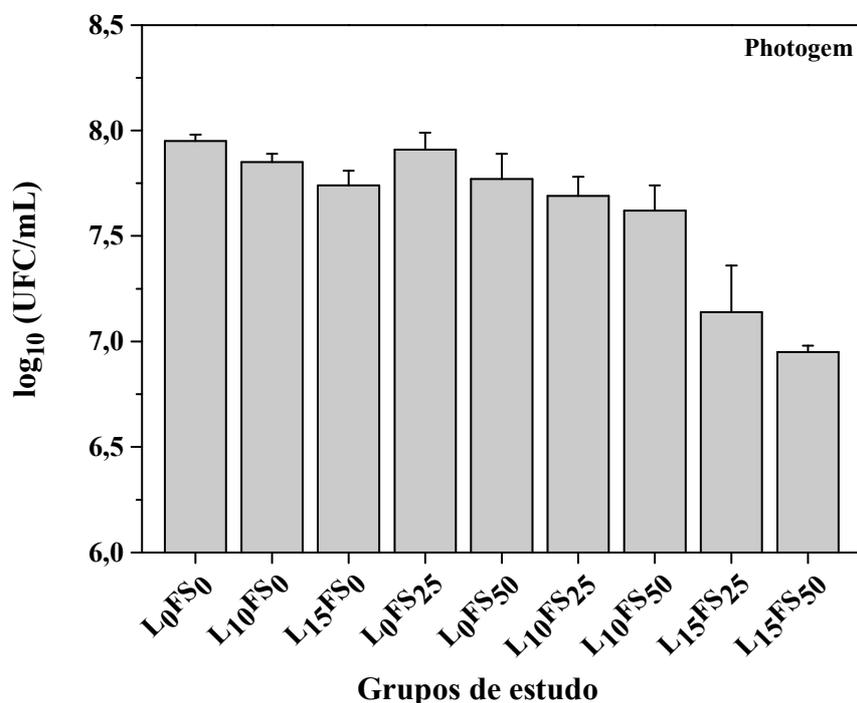
Em um estudo realizado com *Pythium insidiosum*, oomiceto causador da pitiose, os efeitos da IFD com Photogem® e com Photodithazine® foram avaliados e comparados. Neste estudo, os experimentos *in vitro* demonstraram alta eficiência para a clorina quando comparada à porfirina. Além disso, os pesquisadores relataram que para obter uma taxa de inibição semelhante à clorina, foi necessário usar maior concentração de porfirina. (75) Assim, neste estudo os melhores resultados também foram encontrados para o Photodithazine®, o que indica sua melhor ação durante a IFD em micro-organismos.

Para que a IFD seja eficaz, a otimização de diversos parâmetros como a escolha certa do FS e adequada da fonte de luz são essenciais. A escolha de um FS ideal e efetivo é fundamental para o sucesso da técnica, pois além de não apresentar toxicidade para os humanos, deve absorver luz em comprimento de onda adequado e apresentar boa eficiência quântica. Aliado a isso, a preferência pela aplicação de baixas concentrações de FSs acompanhada por baixas fluências pode oferecer a vantagem de se ter um bom efeito bactericida sem induzir danos às demais células presentes no meio.

Pensando nisso, e de acordo com os resultados apresentados de inativação de *S. aureus* em PBS, os próximos experimentos visaram testar os mesmos parâmetros de concentração dos FSs na inativação da bactéria na presença de sangue total. Como a combinação entre a fluência 15 J/cm^2 , para ambos comprimentos de onda aplicados, e concentração de $25 \mu\text{g/mL}$ para ambos FSs mostrou resultado satisfatório de inativação para o micro-organismo em PBS, estes foram os parâmetros de partida para a execução dos experimentos em sangue total. Além disso, como a combinação entre a fluência 30 J/cm^2 para ambos comprimentos de onda e concentração $50 \mu\text{g/mL}$ para ambos FSs foi eficaz na destruição total de *S. aureus*, inativando todas as bactérias viáveis, optou-se por diminuir a fluência a ser aplicada no sangue para minimizar os efeitos colaterais do tratamento, diminuindo os danos às células sanguíneas.

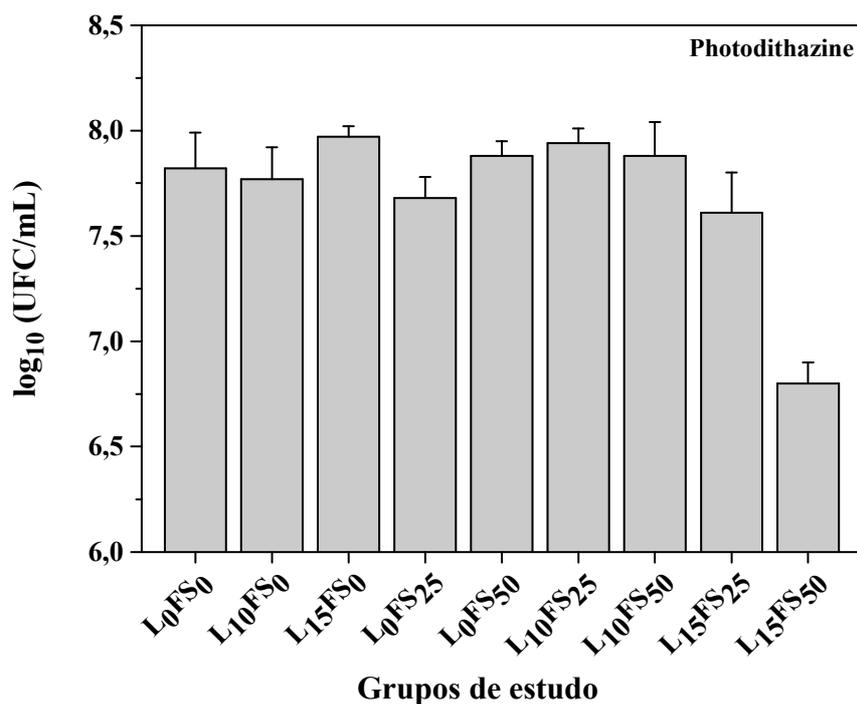
Portanto, para todos os experimentos realizados em sangue, as fluências utilizadas foram menores, sendo de 10 e 15 J/cm^2 . Entretanto, as concentrações dos FSs permaneceram as mesmas do experimento anterior. Os resultados de sobrevivência de *S. aureus* em sangue total após a IFD com Photogem® e Photodithazine® são mostrados nas Figuras 16 e 17.

Figura 16 - Sobrevivência de *S. aureus* em sangue total após IFD com Photogem® em função das fluências L = 0, 10 e 15 J/cm² (630 nm), e das concentrações de FS = 0, 25 e 50 µg/mL. Os valores expressam a média e o desvio padrão.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 17 - Sobrevivência de *S. aureus* em sangue total após IFD com Photodithazine® em função das fluências L = 0, 10 e 15 J/cm² (660 nm), e das concentrações de FS = 0, 25 e 50 µg/mL. Os valores expressam a média e o desvio padrão.



Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com os gráficos, observa-se redução de $1 \log_{10}$ UFC/mL de *S. aureus* no grupo IFD com a maior fluência (15 J/cm^2) e a maior concentração ($50 \mu\text{g/mL}$) para os dois FSs avaliados. Estes resultados diferem dos encontrados na inativação do micro-organismo em PBS. Contudo, nestas condições também não foi observada toxicidade do Photogem® e do Photodithazine® quando avaliados no escuro, nem toxicidade da luz nos comprimentos de onda 630 nm e 660 nm quando avaliados isoladamente em *S. aureus* presente em sangue total.

A inativação de *S. aureus* em sangue total foi muito reduzida comparada à inativação da bactéria em PBS e, isso se deve possivelmente à grande quantidade de elementos celulares e moléculas presentes no sangue, que tornam este meio altamente complexo. A inativação de micro-organismos em amostras que contêm as células em sua forma planctônica e em um ambiente livre de biomoléculas representa uma condição bastante distinta do que ocorre quando a inativação é realizada na presença de sangue. Os fatores que devem ser considerados quando a IFD ocorre em sangue total, e que podem estar relacionados com a baixa resposta de inativação são: (1) a presença das células do sangue, que são também alvos de interação do FS e conseqüentemente da resposta fotodinâmica, (2) a presença dos componentes não celulares, isto é, as biomoléculas, que podem ser carreadores ou ocasionar agregação das moléculas do FS, (3) as próprias características do sangue, como pH e alta absorção óptica no espectro visível podem ter influenciado a resposta fotodinâmica.

As biomoléculas que constituem o sangue, em especial as proteínas, podem ter promovido agregação das moléculas dos FSs. A formação de agregados entre as moléculas do FS é um problema e pode prejudicar a reação fotodinâmica, pois reduz drasticamente a capacidade do FS em gerar as EROs. Os agregados diminuem o tempo de vida dos estados singleto e tripleto do FS, reduzindo seu rendimento quântico, com conseqüente perda de sua eficiência. Estes agregados formam-se, também, à medida que se aumenta a concentração do FS. (65) Para evitar a formação de agregados, é preciso que as moléculas do FS estejam adequadamente solubilizadas, além de estarem biodisponíveis para as reações fotodinâmicas.

Apesar da IFD inativar apenas $1 \log_{10}$ UFC/mL de *S. aureus*, nas condições estudadas, quando a bactéria está em sangue total, esse resultado não é totalmente ruim, pois pensando em casos clínicos, nos quais pacientes que apresentam infecção na corrente sanguínea não respondem ao tratamento com antibióticos, a IFD pode ser uma possibilidade de terapia na redução inicial da quantidade de micro-organismos no sangue, para que o tratamento convencional possa ser empregado. Essa aplicação só seria possível com a IFD em uma circulação extracorpórea, na qual o sangue do paciente, ao passar pelo sistema de circulação

extracorpórea, receberia dosagens adequadas de FS e de irradiação, em quantidade suficiente para eliminar uma porcentagem inicial do micro-organismo.

Além disso, estudos mostraram que a quantidade de bactérias presentes no sangue de pacientes adultos com episódios clínicos significativos de infecção na corrente sanguínea é da ordem de 1 a 30 UFC/mL de sangue, sendo caracterizada por números baixos de bactérias circulantes. (116) Como esse valor não é extremo, quando detectada precocemente, a IFD poderia ser indicada para aplicações no sangue, atuando primariamente no controle de uma parcela dessa população de micro-organismos, até que o próprio sistema imunológico do paciente recrute células de defesa para auxiliar no combate à infecção.

Em relação ao estímulo do sistema imunológico, é conhecido na literatura que a TFD, quando aplicada no tratamento de câncer, além de causar efeitos citotóxicos diretos em células tumorais, é responsável por induzir a liberação de moléculas pró-inflamatórias e estimular tanto a resposta inata quanto a resposta adaptativa do sistema imunológico. (117,118) Porém, não é apenas na terapia anticâncer que esses efeitos acontecem. Estudos têm mostrado que os efeitos imunológicos da TFD tornam a técnica mais eficaz quando utilizada no tratamento de infecções microbianas devido à infiltração aumentada de macrófagos e neutrófilos nas regiões infectadas, o que potencializa ainda mais o tratamento. Desse modo, a TFD pode atuar no estímulo da resposta imunológica nos organismos, recrutando células específicas que auxiliam na eliminação do foco infeccioso (117,119), sendo, portanto, considerada uma técnica auxiliar ao tratamento primário de infecções.

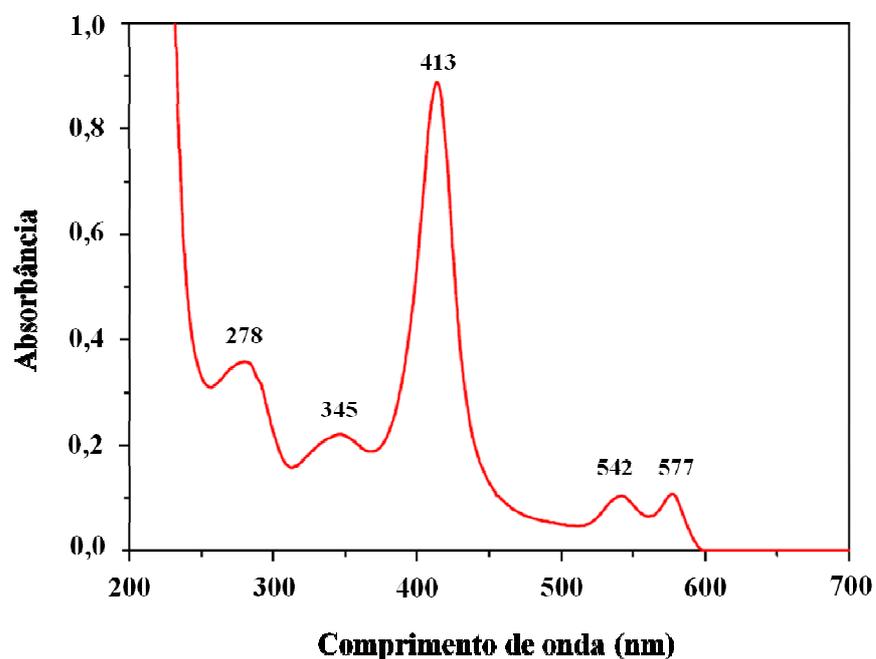
Nesse sentido, Tanaka e colaboradores (2011) demonstraram que IFD com Photofrin®, uma porfirina semelhante ao Photogem®, quando aplicada na artrite séptica infectada por *S. aureus* metilicina resistente no joelho de ratos, poderia tratar a infecção não apenas pela inativação direta das bactérias, mas também pela estimulação da defesa imune do hospedeiro. Assim, segundo os autores, o tratamento fotodinâmico, aplicado com uma fluência apropriada capaz de causar tanto a morte das bactérias quanto a acumulação de neutrófilos na área da ferida infectada, pode resultar em um novo mecanismo de ação. Neste estudo, os pesquisadores mostraram uma correlação entre os neutrófilos acumulados no local das infecções e o efeito bactericida após a IFD. Esse novo mecanismo de ação que associa a resposta imune é de interesse porque os neutrófilos são os principais responsáveis pela defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas. (120)

Para garantir que a IFD possa ser uma técnica alternativa na aplicação em sangue, com a finalidade de controlar micro-organismos, amostras sanguíneas foram avaliadas por meio de ensaios de hemólise, que determinaram a porcentagem de dano causado nas membranas dos

eritrócitos quando estas células foram submetidas à IFD com Photogem® e com Photodithazine®, em sangue total. Como alguns processos, técnicas e moléculas podem causar hemólise nos eritrócitos, seus potenciais hemolíticos têm sido amplamente utilizados para estudar e comparar suas capacidades de agressão à membrana plasmática destas células. Assim, os eritrócitos têm sido alvos de estudo e, pelo fato de suas membranas serem particularmente sensíveis ao estresse oxidativo, devido ao alto teor de ácidos graxos poli-insaturados, representam um sistema importante de avaliação dos danos gerados pelo estresse oxidativo. (121)

Como a hemólise corresponde à lise da membrana dos eritrócitos e, esse dano resulta na liberação da hemoglobina para o plasma, foi possível quantificar esse processo monitorando a intensidade de absorção da hemoglobina liberada. O espectro de absorção óptica da hemoglobina está apresentado na Figura 18 e a porcentagem de hemólise dos eritrócitos foi determinada pela medida de absorbância no comprimento de onda 413 nm.

Figura 18 - Espectro de absorção da hemoglobina evidenciando as bandas de absorção nos comprimentos de onda 278, 345, 413, 542 e 577 nm.

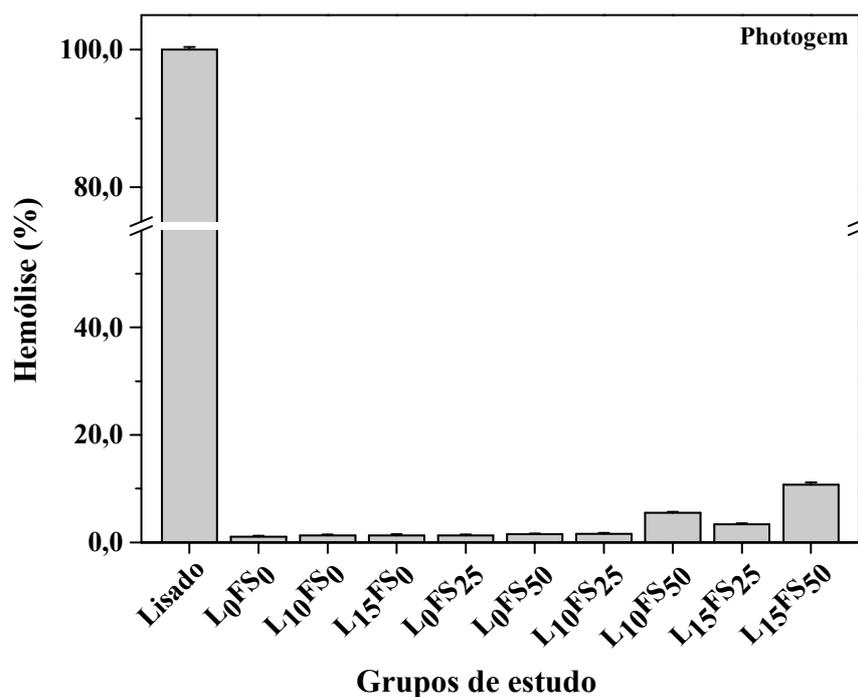


Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados da porcentagem de hemólise para as condições estudadas com o Photogem® em associação com luz no comprimento de onda 630 nm são mostrados na Figura 19, e os resultados da porcentagem de hemólise para o Photodithazine® em associação com

luz no comprimento de onda 660 nm são mostrados na Figura 20. Esses ensaios de hemólise foram realizados com eritrócitos na presença de sangue total. A porcentagem máxima de hemólise (100%), ou hemólise total, apresentada nos gráficos, foi obtida pela suspensão dos eritrócitos em água destilada ao invés da suspensão em soro fisiológico, para provocar a ruptura da membrana destas células e liberar para o meio externo toda a hemoglobina contida em seu interior. O valor da absorbância nesta condição forneceu a máxima hemólise. A partir dos espectros de absorção da hemoglobina obtidos para cada grupo de estudo foram calculadas as porcentagens de hemólise para todas as condições estudadas.

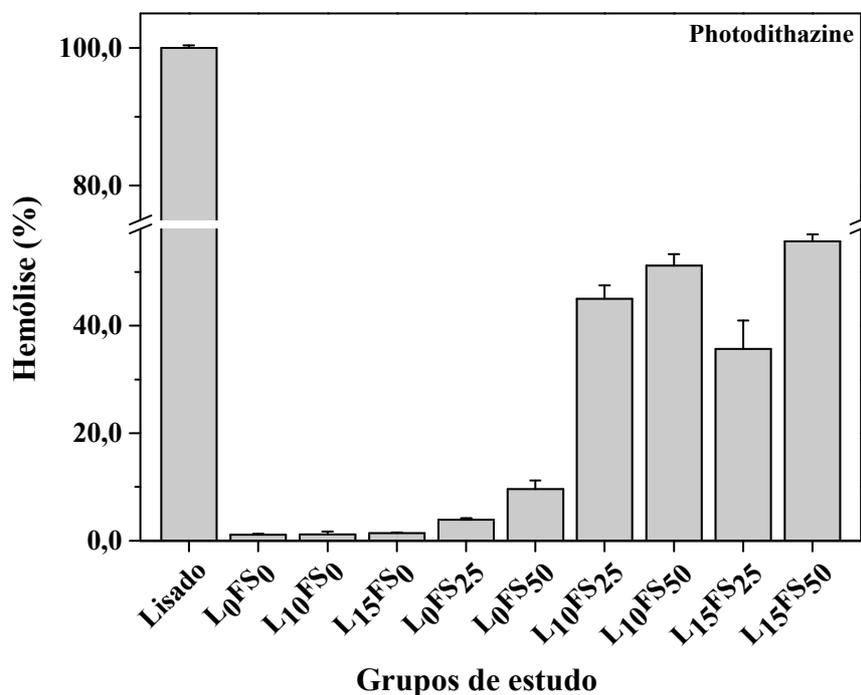
Figura 19 - Porcentagem de hemólise dos eritrócitos em sangue total após IFD com Photogem® em função das fluências $L = 0, 10$ e 15 J/cm^2 (630 nm), e das concentrações de $\text{FS} = 0, 25$ e $50 \text{ } \mu\text{g/mL}$. Os valores expressam a média e o desvio padrão.



Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com a Figura 19, observa-se baixo valor de porcentagem de hemólise para os eritrócitos em sangue total das condições controle, controle da luz e controle do FS Photogem®. As porcentagens de hemólise dos eritrócitos desses grupos variaram de 1 a 1,5%. Já para os eritrócitos em sangue total dos grupos IFD, os valores de porcentagem de hemólise aumentaram, variando de 1,6 a 10,7%, mas ainda assim, são considerados valores baixos.

Figura 20 - Porcentagem de hemólise dos eritrócitos em sangue total após IFD com Photodithazine® em função das fluências $L = 0, 10$ e 15 J/cm^2 (660 nm), e das concentrações de FS = 0, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Os valores expressam a média e o desvio padrão.



Fonte: Elaborada pela autora.

A hemólise, em pequenas proporções, é considerada um processo normal e intrínseco do organismo. Cerca de 0,8 a 1% do total de eritrócitos de um indivíduo são hemolisados diariamente e, esse processo é compensado pela produção de novos eritrócitos que são liberados na corrente sanguínea. (22) Além disso, as porcentagens de hemólise encontradas nos grupos controles podem ser decorrentes da manipulação das suspensões das células. Já a hemólise quando ocorre em grandes proporções pode causar sérios problemas e, geralmente, é desencadeada por reações a alguns medicamentos, ou por algum processo autoimune devido à presença de hemoglobinas anormais, ou por trauma físico, como por exemplo, no caso de circulação extracorpórea. (22)

Com base nos gráficos apresentados, a IFD com Photogem® não provocou elevadas porcentagens de hemólise nos eritrócitos, em sangue total, quando comparada à IFD com Photodithazine® (Figura 20). Analisando estes resultados, observa-se a ocorrência de pequena quantidade de hemólise, em torno de 1 a 1,5%, para os eritrócitos das condições controle e controle da luz, indicando que a luz no comprimento de onda 660 nm, nas fluências de escolha, não danificaram a membrana das células. Entretanto, para os eritrócitos dos

grupos controle do FS e IFD, os valores de porcentagem de hemólise aumentaram muito, variando em torno de 4 a 56%. Esses achados evidenciam maior grau de toxicidade do Photodithazine® para os eritrócitos, sendo a aplicação da IFD, nas condições estudadas, muito tóxica para o sangue.

A diferença encontrada nas porcentagens de hemólise entre os FSs estudados pode estar relacionada à capacidade destas moléculas se ligarem mais ou menos às membranas dos eritrócitos. Membranas biológicas parecem ser alvos importantes para muitos FSs. (122) Estudos na literatura têm demonstrado que a hemólise ocorre devido à foto-oxidação das proteínas intrínsecas à membrana plasmática, que estão ligadas aos fosfolipídios, resultando na formação de poros e no aumento da mobilidade dos fosfolipídios. Esse aumento na mobilidade dos fosfolipídios provoca a ruptura da membrana das células e consequente liberação da hemoglobina. Aliado a isso, a oxidação de fosfolipídios insaturados, constituintes da membrana dos eritrócitos, pelas EROs produzidas durante as reações fotodinâmicas também aumenta a mobilidade dos fosfolipídios, favorecendo o processo de formação de poros e ruptura da membrana. (123)

5.3.3 Análise quantitativa e qualitativa do sangue total após IFD com Photogem®

Como o ensaio de hemólise determina apenas o dano ocorrido nas células vermelhas do sangue, isto é, nos eritrócitos, para realizar uma análise quantitativa e qualitativa das outras células sanguíneas, outras técnicas foram necessárias. Desse modo, novos experimentos de IFD foram realizados em sangue total, apenas com o Photogem®, pois este foi o FS que apresentou menor porcentagem de hemólise aos eritrócitos do grupo IFD, em comparação ao Photodithazine®. Além disso, como o melhor resultado para a inativação de *S. aureus* foi a combinação entre fluência 15 J/cm² e concentração de 50 µg/mL, estes foram os parâmetros escolhidos para serem avaliados nestes experimentos.

A análise quantitativa do sangue foi realizada por meio de hemogramas no Laboratório Maricondi, em São Carlos/SP, e os constituintes avaliados foram eritrócitos, hemoglobina e hematócrito pertencentes à série vermelha, e leucócitos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, monócitos pertencentes à série branca, além das plaquetas. Os resultados desta análise foram comparados aos valores de referência estabelecidos para mulheres e estão organizados na Tabela 2.

Tabela 2 - Análise quantitativa do sangue total após IFD com Photogem® nas fluências L = 0 e 15 J/cm² (630 nm) e na concentração de FS = 50 µg/mL. Os valores de referência mostrados na tabela são para mulheres e os valores dos grupos de estudo expressam a média e o desvio padrão.

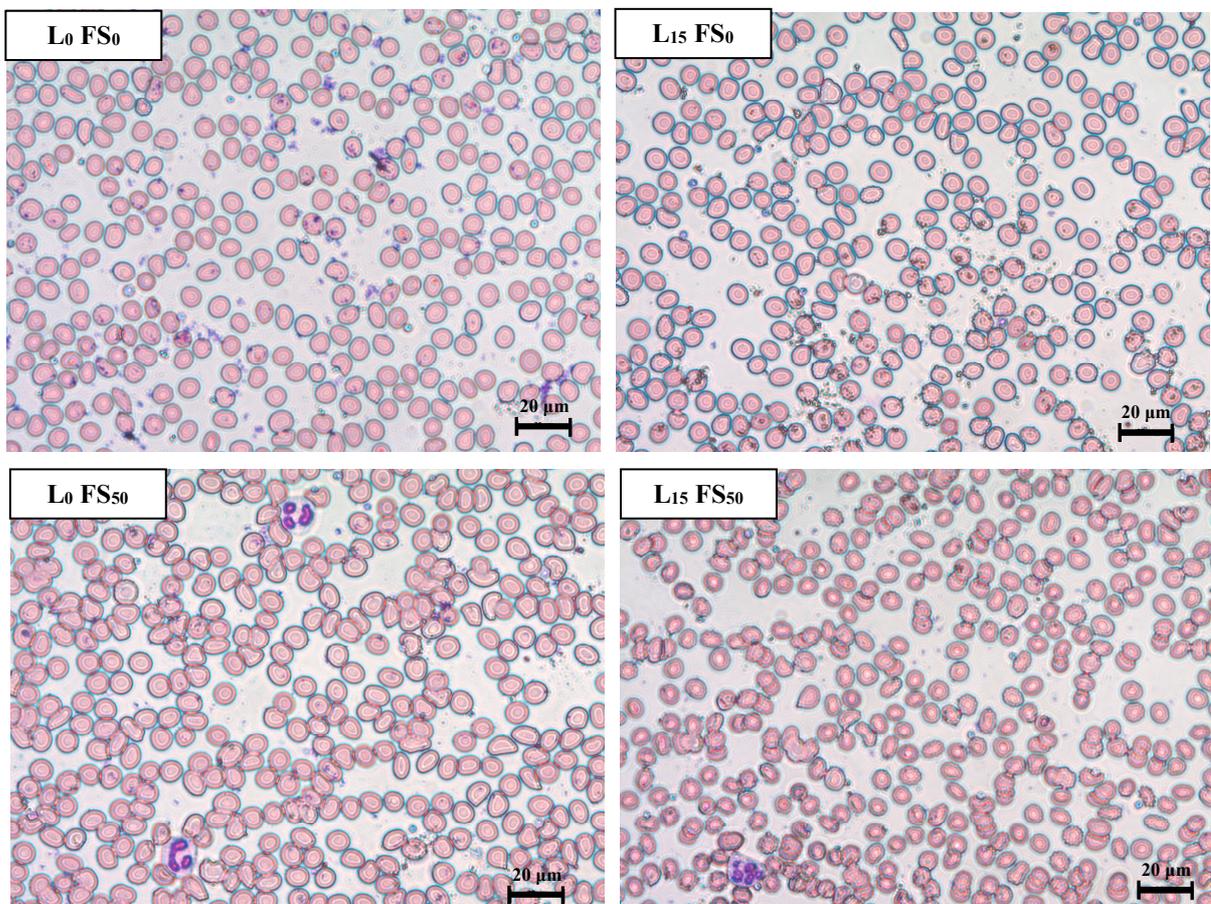
| | Valores de referência | L₀FS₀ | L₁₅FS₀ | L₀FS₅₀ | L₁₅FS₅₀ |
|--------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Eritrócitos | 4,2 a 5,4 milhões/mm ³ | 4,2 ± 0,1 | 4,0 ± 0,5 | 4,7 ± 0,6 | 4,6 ± 0,4 |
| Hemoglobina | 12 a 16 g/dL | 11,9 ± 0,4 | 11 ± 2 | 14 ± 2 | 13 ± 1 |
| Hematócrito | 35 a 47% | 35 ± 1 | 34 ± 5 | 40 ± 5 | 39 ± 3 |
| Leucócitos | 4.000 a 10.000/mm ³ | 5.600 ± 800 | 6.000 ± 500 | 5.500 ± 200 | 5.400 ± 900 |
| Eosinófilos | 50 a 400/mm ³ | 200 ± 50 | 220 ± 60 | 200 ± 30 | 240 ± 50 |
| Neutrófilos | 1.800 a 7.000/mm ³ | 3.700 ± 500 | 3.400 ± 400 | 3.600 ± 200 | 3.400 ± 400 |
| Linfócitos | 1.500 a 4.000/mm ³ | 1.400 ± 200 | 1.600 ± 300 | 1.300 ± 300 | 1.400 ± 400 |
| Monócitos | 150 a 800/mm ³ | 330 ± 60 | 370 ± 60 | 270 ± 60 | 330 ± 60 |
| Plaquetas | 150.000 a 450.000/mm ³ | 188.000 ± 30.000 | 206.000 ± 10.000 | 167.000 ± 40.000 | 172.000 ± 40.000 |

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com os resultados, observa-se que os parâmetros analisados mantiveram-se dentro dos valores de referência. Os resultados dos grupos estudados não se mostraram alterados para nenhum constituinte avaliado quando comparado aos resultados do grupo controle. Além disso, pequenas variações, para mais ou para menos, não necessariamente indicam alguma doença. Portanto, esses resultados mostram que a IFD com Photogem®, em sangue total, nas condições avaliadas, não causou danos aos constituintes celulares avaliados.

Já a análise qualitativa do sangue total foi realizada pela confecção de lâminas de esfregaços sanguíneos corados com May Grünwald-Giemsa, no mesmo laboratório de análises clínicas citado anteriormente. As células avaliadas foram os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas e, os resultados desta análise são apresentados na Figura 21.

Figura 21 - Imagens de esfregaços de sangue total após IFD com Photogem® nas fluências $L = 0$ e 15 J/cm^2 (630 nm) e na concentração de FS = $50 \text{ }\mu\text{g/mL}$. As imagens foram obtidas em microscópio óptico com aumento de 100x. A escala está representada em barra na cor preta no canto inferior direito e corresponde a $20 \text{ }\mu\text{m}$.



Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com as imagens, não foram observadas alterações morfológicas nos eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Portanto, o Photogem® não apresentou efeito tóxico para as células sanguíneas, na concentração testada, quando avaliado em sangue total e, a luz, no comprimento de onda 630 nm, com fluência 15 J/cm², também não mostrou toxicidade para as células do sangue. Desse modo, os esfregaços sanguíneos confirmam os resultados obtidos pelos hemogramas.

Todos os resultados, quantitativos e qualitativos, foram analisados pelo hematologista responsável do laboratório que afirmou não haver dano nas células avaliadas. Essa análise levou em consideração a contagem padrão de todas as células avaliadas e também a verificação da morfologia de cada tipo celular estudado. No entanto, qualquer mudança que possa ocorrer na morfologia dos eritrócitos poderá refletir na vida útil destas células, e a severidade do dano, se causado no organismo, dependerá da quantidade de células morfológicamente afetadas.

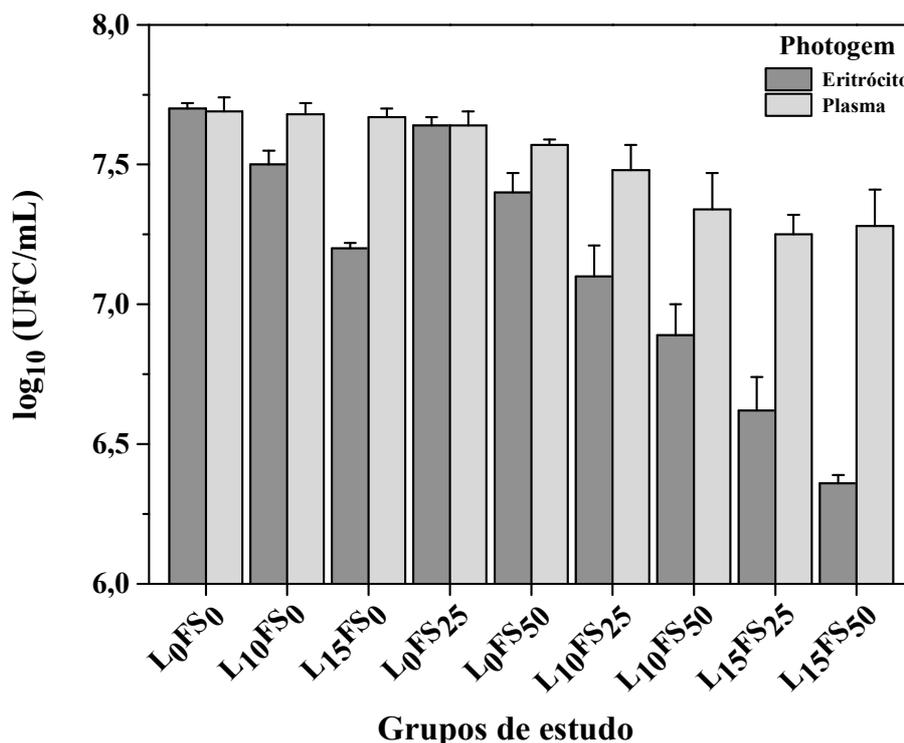
5.3.4 IFD de *S. aureus* nos hemocomponentes e análise da hemólise

Como a inativação de *S. aureus* em sangue total mostrou ser um processo difícil, apresentando menor índice de morte nesta condição, outros experimentos foram realizados no intuito de entender se a inativação do micro-organismo foi prejudicada por algum componente sanguíneo específico. Desse modo, experimentos de IFD de *S. aureus* foram delineados nos dois principais hemocomponentes: eritrócitos e plasma rico em plaquetas. Considerando que o Photogem® foi o FS que promoveu menor porcentagem de hemólise nos eritrócitos, quando avaliados em sangue total, todos os experimentos apresentados nesta subseção de resultados foram realizados apenas com este FS.

Na Figura 22, estão os resultados da sobrevivência de *S. aureus* na presença de eritrócitos e na presença de plasma rico em plaquetas após a IFD com Photogem®, nas fluências 10 e 15 J/cm² e concentrações 25 e 50 µg/mL. Os resultados mostram que a inativação de *S. aureus*, nos componentes sanguíneos separados, ocorreu de forma mais satisfatória nos eritrócitos, sendo a redução de 1,3 log₁₀ UFC/mL para o grupo IFD na maior fluência (15 J/cm²) e na maior concentração do Photogem® (50 µg/mL). Em relação à inativação do micro-organismo na presença do plasma, a redução foi de apenas 0,4 log₁₀ UFC/mL para o grupo IFD nas mesmas condições de fluência e concentração do FS. Estes

resultados indicam que o plasma parece ser o principal componente sanguíneo responsável por dificultar e/ou impedir o processo de inativação da bactéria na presença de sangue total.

Figura 22 - Sobrevivência de *S. aureus* em eritrócitos e em plasma rico em plaquetas após IFD com Photogem® em função das fluências $L = 0, 10$ e 15 J/cm^2 (630 nm), e das concentrações de FS = 0, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Os valores expressam a média e o desvio padrão.



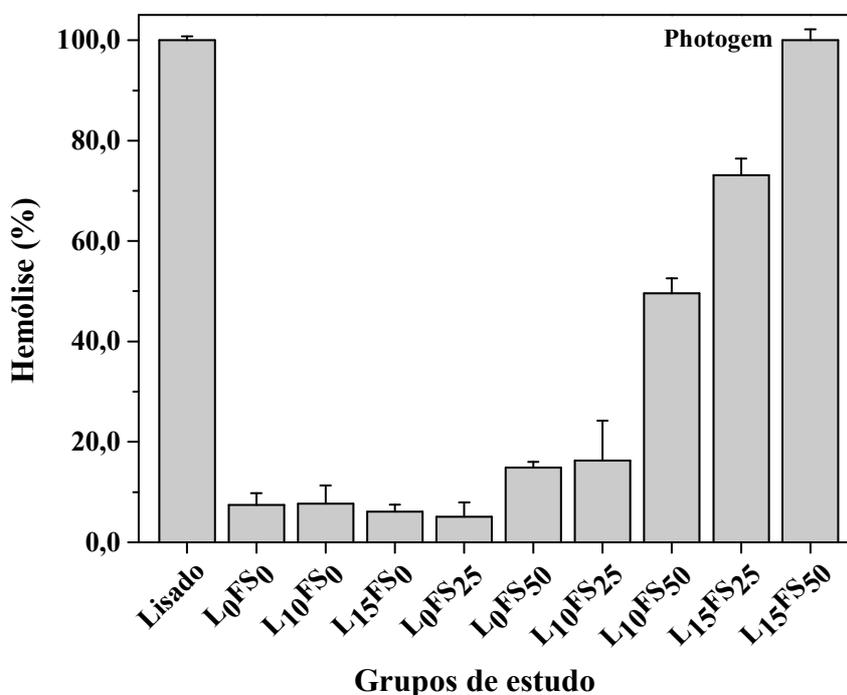
Fonte: Elaborada pela autora.

O plasma é essencialmente uma solução aquosa na qual as proteínas estão em suspensão. Pelo fato de ser constituído por diversas moléculas, o plasma sanguíneo torna-se um meio muito complexo. As moléculas presentes neste componente podem ser o principal fator de impedimento para o sucesso da IFD, uma vez que o FS ao entrar em contato com esse meio, interage com as moléculas presentes, que impedem sua biodisponibilidade para a reação fotodinâmica, diminuindo consideravelmente a eficácia da técnica. Portanto, a variedade de proteínas presente no plasma afeta a capacidade de ativação dos FS. Somado a isso, o fato das moléculas dos FS ligarem-se nas proteínas do plasma faz com que elas não consigam entrar em contato com os micro-organismos, evitando assim sua inativação.

Esse efeito de agregação pode ser diminuído com modificações na estrutura dos FSs, além da associação do FS com diferentes sistemas de entrega, como é o caso de um estudo que associou as moléculas de FS a lipossomas. (91)

Em contrapartida, a presença do plasma pode ser fundamental para que o processo de hemólise não aconteça ou aconteça em menor porcentagem. É conhecido na literatura que alguns componentes do plasma sanguíneo são responsáveis por proteger os eritrócitos contra a hemólise causada por trauma mecânico e por hipotonicidade, sendo a albumina o principal componente do plasma responsável por essa proteção. (124) Assim, quando o sangue passa pelo processo de centrifugação para separação dos hemocomponentes, o efeito protetor do plasma aos eritrócitos se perde e, com isso, os eritrócitos tornam-se vulneráveis aos efeitos da ação fotodinâmica. Esse fato foi observado ao realizar os experimentos de IFD de *S. aureus* na presença dos eritrócitos isolados. A hemólise ocasionada aos eritrócitos está mostrada na Figura 23.

Figura 23 - Porcentagem de hemólise dos eritrócitos após IFD com Photogem® em função das fluências $L = 0, 10$ e 15 J/cm^2 (630 nm), e das concentrações de FS = 0, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Os valores expressam a média e o desvio padrão.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados indicam hemólise total (100%) dos eritrócitos do grupo IFD na condição fluência 15 J/cm^2 e concentração $50 \text{ }\mu\text{g/mL}$. Quando se compara os resultados deste experimento com os resultados de hemólise dos eritrócitos na presença do plasma, isto é, no experimento realizado em sangue total (Figura 19), pode-se observar considerável diferença nos valores de hemólise. Como, neste caso, a IFD ocorreu em um ambiente onde somente os eritrócitos e o micro-organismo estavam presentes, o Photogem® possivelmente interagiu fortemente com a membrana das células, ligando-se a elas. Esse fato pode justificar a elevada porcentagem de hemólise encontrada nos eritrócitos, nas condições estudadas. Além disso, como o plasma não estava presente nestas amostras, provavelmente as moléculas do FS ficaram biodisponíveis para as reações fotodinâmicas e as EROs formadas atingiram tanto o *S. aureus* quanto os eritrócitos, não havendo seletividade na técnica, neste caso.

Quanto ao processo de irradiação dos eritrócitos contaminados com *S. aureus*, pode-se dizer que a luz vermelha no comprimento de onda 630 nm foi absorvida pela hemoglobina, apesar de, nessa região do espectro, a absorção da hemoglobina ser consideravelmente menor. Por tal motivo, a maioria dos trabalhos encontrados na literatura que estudaram a descontaminação de concentrados de eritrócitos por meio da IFD, utilizaram como FS moléculas que tem seu máximo de absorção em comprimentos de onda em torno de 700 nm , referente à classe das ftalocianinas, eficientes na inativação de diversas espécies de vírus. (91,125,126)

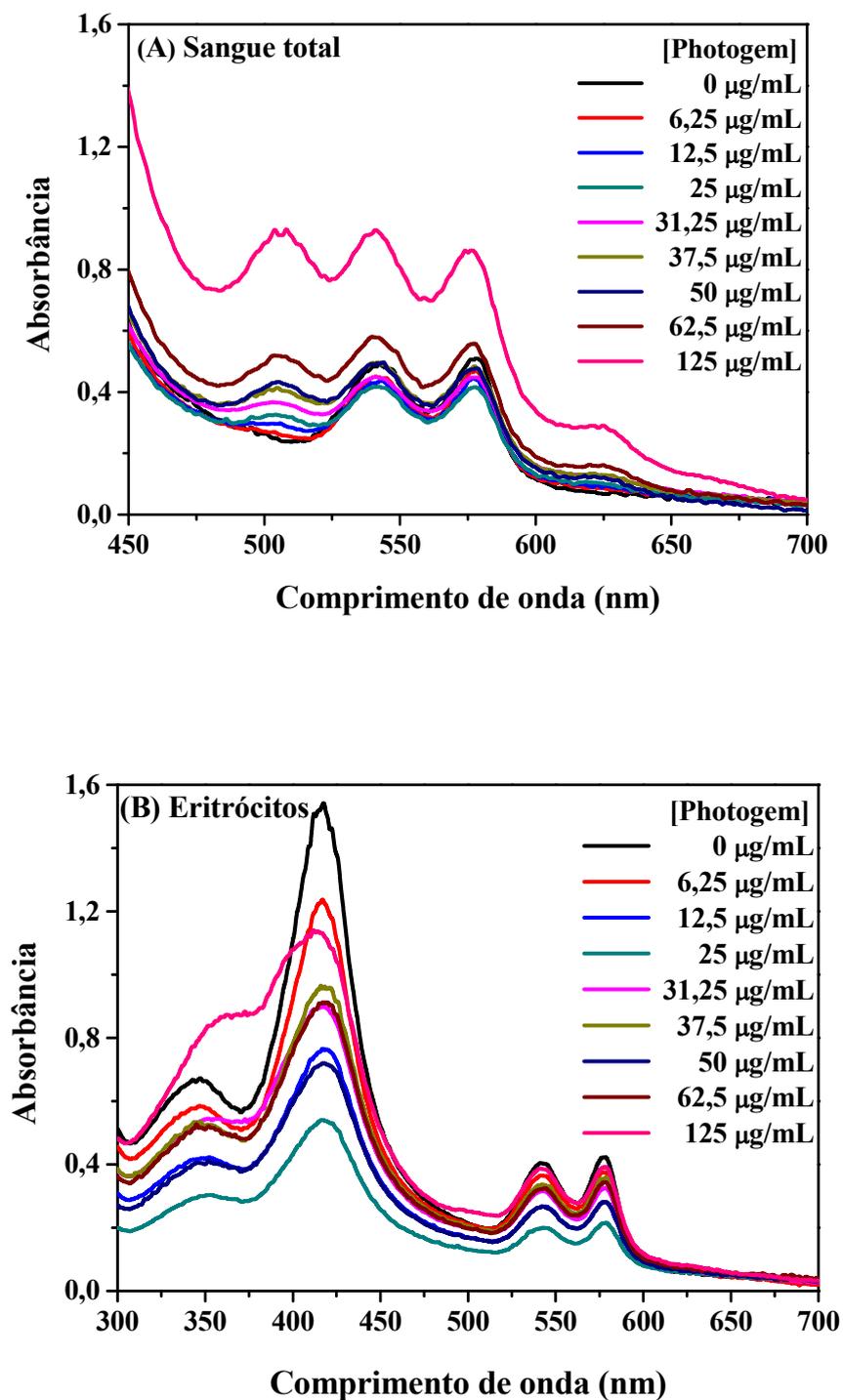
5.3.5 Análise da interação entre Photogem® e sangue

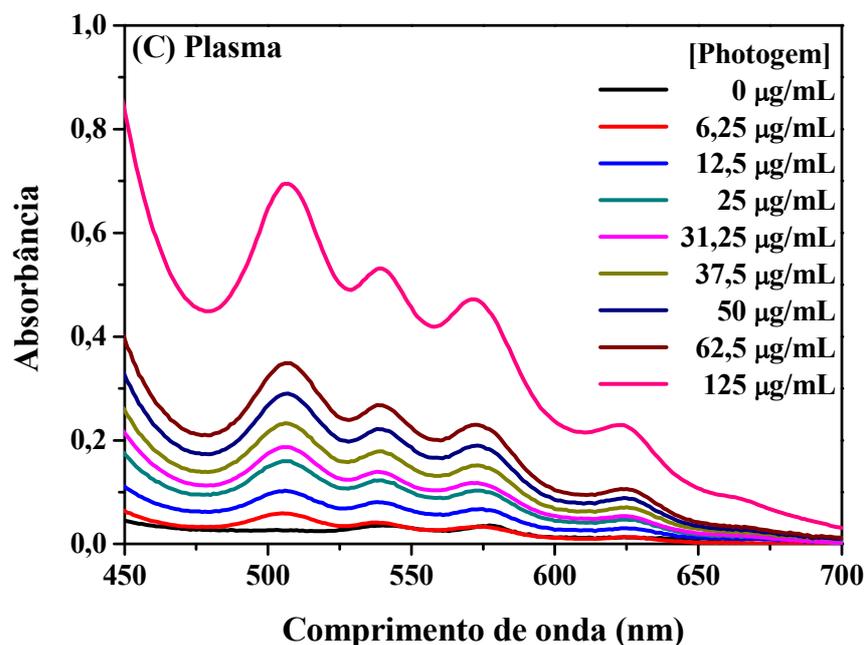
Com o objetivo de analisar a interação do Photogem® com o sangue total e verificar o local de ligação do FS nos eritrócitos e no plasma, experimentos foram conduzidos na espectroscopia de absorção. Para isso, o sangue total foi avaliado em contato com diferentes concentrações do Photogem® e, após a centrifugação, os eritrócitos e o plasma também foram avaliados. Os espectros de absorção do sangue total, dos eritrócitos e do plasma, nas diferentes concentrações do FS, são mostrados na Figura 24 (A, B, C).

Com a análise das medidas de absorção foi possível identificar distribuição do FS nos dois principais componentes sanguíneos após a centrifugação do sangue total. No entanto, e de acordo com a Figura 24, observa-se que o Photogem® está interagindo mais com o plasma, uma vez que as bandas de absorção do FS são vistas mais claramente após o processo de centrifugação (Figura 24C). Além disso, neste hemocomponente, os picos aumentaram com o

aumento da concentração do FS, seguindo um comportamento linear, eventos não observados nas medidas de absorção dos eritrócitos (Figura 24B).

Figura 24 - Espectros de absorção do sangue total (A), dos eritrócitos (B) e do plasma rico em plaquetas (C) nas concentrações de Photogem® FS = 0; 6,25; 12,5; 25; 31,25; 37,5; 50; 62,5; 125 $\mu\text{g/mL}$.





Fonte: Elaborada pela autora.

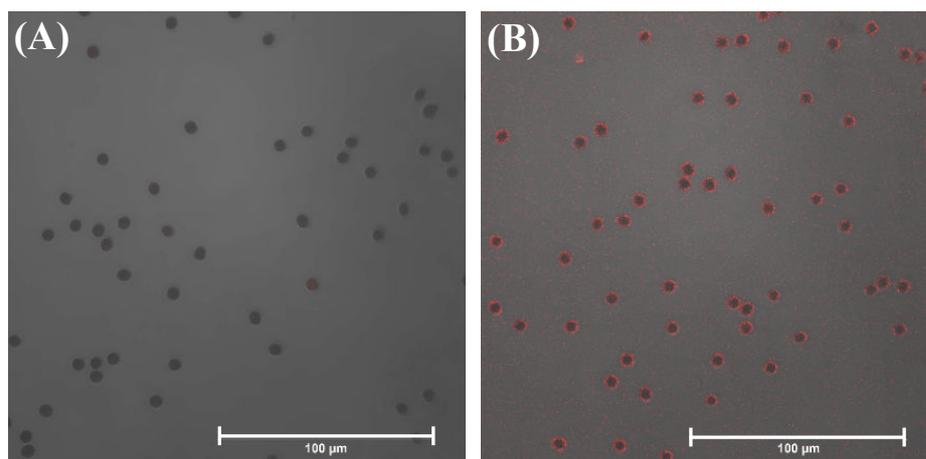
Como durante o processo de IFD uma porcentagem dos eritrócitos sofreu hemólise e, para melhor entender a interação do Photogem® com os eritrócitos, uma concentração específica do FS (50 µg/mL) foi utilizada para observação destas células na microscopia confocal. Na Figura 25 são mostradas as imagens microscópicas dos eritrócitos sem o Photogem® (A) e com o Photogem® (B). De acordo com as imagens é possível observar que o FS acumula-se principalmente na membrana dos eritrócitos.

Na Figura 26 é possível observar o sinal de fluorescência em duas regiões no eritrócito após contato com o Photogem®: no interior e na membrana. De acordo com a Figura 26B, que mostra a forma típica da fluorescência do Photogem®, é possível observar que esta fluorescência é maior na membrana do eritrócito e, esse fato também explica a elevada porcentagem de hemólise encontrada após a IFD em eritrócitos.

Estes resultados confirmam que o Photogem® ligou-se preferencialmente na membrana dos eritrócitos e, que na ausência do plasma, essa interação mostrou-se muito tóxica para estas células. Mesmo a inativação do *S. aureus* sendo melhorada quando a IFD aconteceu em um ambiente em que apenas os eritrócitos estavam presentes, esta condição não é ideal para estas células, que sofreram com os danos oxidativos do processo. Portanto, é

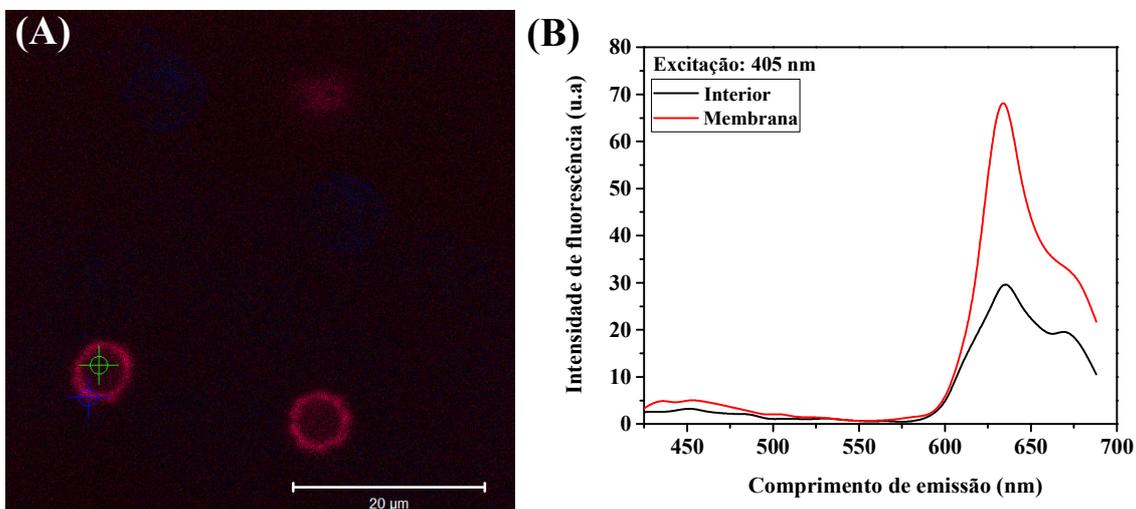
preferível que a IFD ocorra em sangue total, pois nesta condição o plasma protegeu as células de maiores danos, mesmo obtendo um resultado menor de inativação do micro-organismo.

Figura 25 - (A) Imagem de luz transmitida dos eritrócitos na ausência de Photogem® com emissão de fluorescência endógena (600-700 nm). (B) Imagem de luz transmitida superposta à imagem de fluorescência do Photogem® na concentração 50 µg/mL (emissão: 600-700 nm). As imagens foram obtidas em microscópio confocal e a escala está representada em barra na cor branca no canto inferior direito e corresponde a 100 µm.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 26 - (A) Imagem espectral de fluorescência dos eritrócitos com Photogem® na concentração 50 µg/mL. A imagem foi obtida em microscópio confocal e a escala está representada em barra na cor branca no canto inferior direito e corresponde a 20 µm. (B) Emissão da fluorescência de duas regiões de um eritrócito. A curva em preto representa a emissão de fluorescência do interior do eritrócito e a em vermelho representa a emissão de fluorescência da membrana do eritrócito.

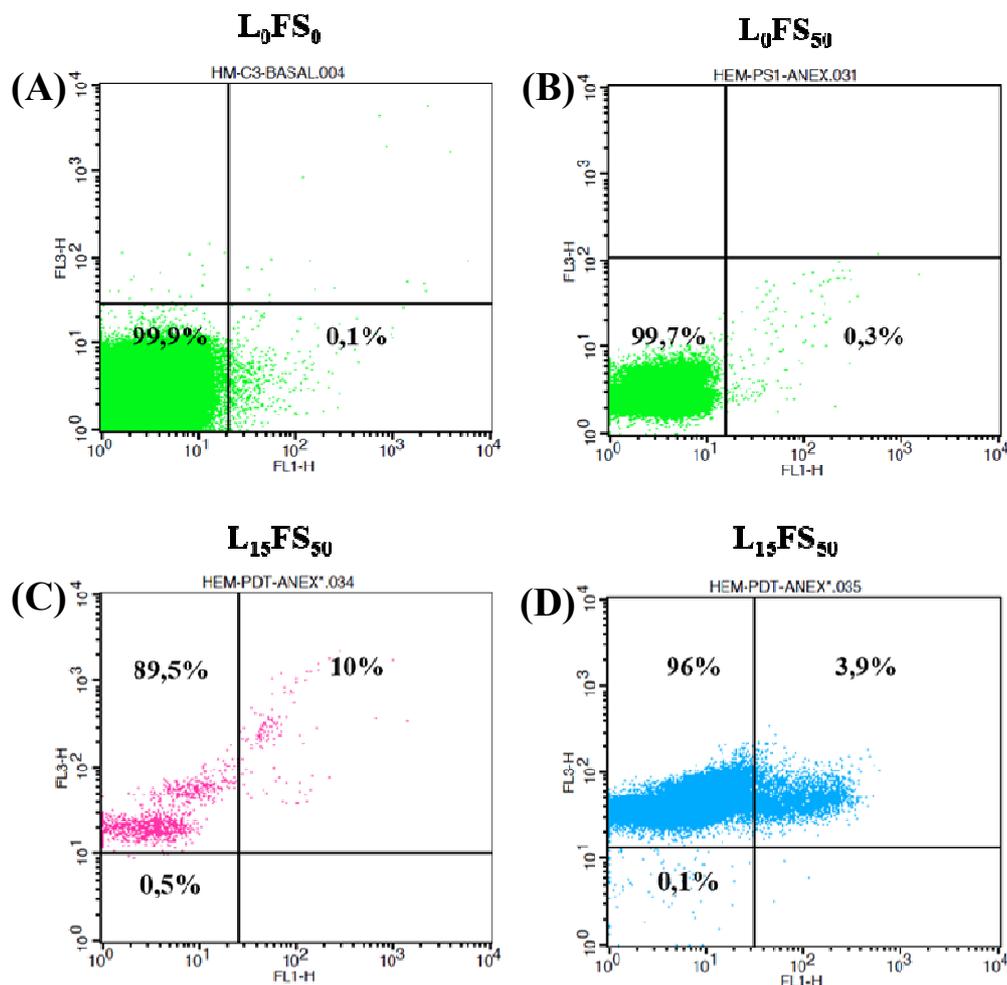


Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.6 Análise da viabilidade dos eritrócitos e das plaquetas após IFD com Photogem®

Como os experimentos de IFD nos hemocomponentes mostraram que os eritrócitos foram muito atingidos pelas reações oxidativas, outros experimentos foram conduzidos no intuito de determinar o processo de morte, analisando os índices de viabilidade e apoptose dos eritrócitos e das plaquetas presentes no plasma sanguíneo após a IFD com Photogem®. Esses experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da UNESP de Botucatu. Os resultados dos índices de viabilidade para os eritrócitos são mostrados na Figura 27.

Figura 27 - Ensaio de citometria de fluxo evidenciando os *dot plots* com as porcentagens de viabilidade dos eritrócitos nas condições: (A) controle, (B) controle do Photogem® FS = 50 µg/mL, (C) eritrócitos com tamanho normal após IFD com Photogem® FS = 50 µg/mL e fluência L = 15 J/cm² (630 nm) e (D) eritrócitos com tamanho reduzido após IFD com Photogem® FS = 50 µg/mL e fluência L = 15 J/cm² (630 nm).



Fonte: Elaborada pela autora.

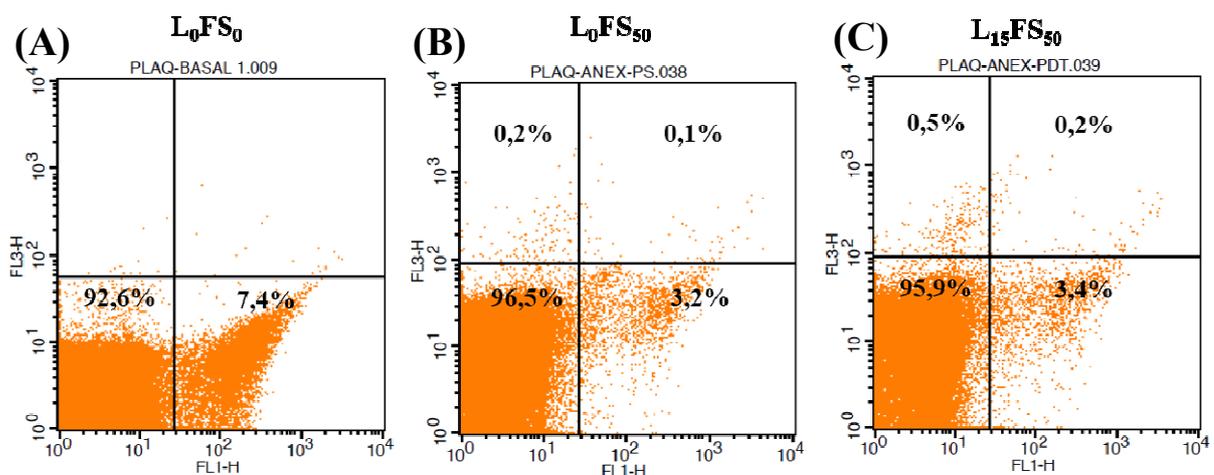
Inicialmente, para os eritrócitos, foram lidos 2.026.899 eventos dos quais, no *gate* delimitado como área correspondente aos eritrócitos de padrão normal, 1.183.073 foram identificados, sendo estas células correspondentes ao grupo controle. Para as análises dos eritrócitos do grupo controle a viabilidade foi de 99,9% e o índice de apoptose foi de 0,1% (Figura 27A). Para os eritrócitos do grupo controle do FS, isto é, aqueles que receberam apenas Photogem® na concentração de 50 µg/mL a viabilidade foi de 99,7% e o índice de apoptose foi de 0,3 (Figura 27B). Após a aplicação da IFD foi possível observar o aparecimento de duas populações de eritrócitos, uma com células em tamanho normal e outra com células em tamanho bem reduzido. Isto pode sugerir que a técnica atuou na membrana dos eritrócitos desregulando a bomba iônica e/ou formando poros na membrana, que permitiu o extravasamento do material intracelular.

Ao analisar essas duas populações, foi observado que após a IFD a viabilidade dos eritrócitos com tamanho normal foi de 0,5% e o índice de apoptose foi de 10%, sendo 89,5% referente ao processo de necrose (Figura 27C). No entanto, esse valor de necrose não é real para estas células, uma vez que os eritrócitos humanos não possuem núcleo e, por esse motivo, não poderiam ser marcados pelo iodeto de propídeo. Assim, esse valor de necrose provavelmente está relacionado à interferência da fluorescência do Photogem®, que foi lida no mesmo canal da fluorescência do iodeto de propídeo, indicando um artefato de técnica. Para os eritrócitos com tamanho reduzido, após a IFD a viabilidade foi de 0,1% e o índice de apoptose foi de 3,9%, sendo 96% referente à necrose (Figura 27D). No entanto, e novamente, esse valor de necrose não é real para estas células, pois os eritrócitos humanos não possuem núcleo e não poderiam ser marcados pelo iodeto de propídeo. Assim, esse valor de necrose provavelmente está relacionado à interferência da fluorescência do Photogem®, indicando um artefato de técnica.

De acordo com os resultados apresentados, foi observado elevada porcentagem de dano às células, mostrando que a IFD com Photogem® na concentração de 50 µg/mL associada à fluência 15 J/cm² foi tóxica para os eritrócitos quando realizada na ausência do plasma. Os eritrócitos são propensos a modificações devido ao ambiente altamente oxigenado, sendo vulneráveis ao estresse oxidativo e auto-oxidação da hemoglobina, uma vez que não possuem núcleo nem organelas citoplasmáticas que poderiam reparar de alguma maneira estes efeitos. Estes resultados estão de acordo com o que foi discutido anteriormente, pois os eritrócitos tratados pela IFD, na ausência do plasma, apresentou 100% de hemólise, indicando destruição total destas células. Portanto, após o tratamento com a IFD com Photogem® estas células tornaram-se inviáveis para o transporte de oxigênio.

Já para as plaquetas, os resultados dos índices de viabilidade, bem como de apoptose estão mostrados na Figura 28. Para as plaquetas foram lidos 200.000 eventos dos quais, no *gate* delimitado como área correspondente às plaquetas de padrão normal, 122.696 foram identificados, sendo estes fragmentos de células correspondentes ao controle. Para as análises das plaquetas do grupo controle a viabilidade foi de 92,6% e o índice de apoptose foi de 7,4% (Figura 28A). Para as plaquetas do grupo controle do FS, que receberam apenas Photogem® na concentração de 50 µg/mL, a viabilidade foi de 96,5% e o índice de apoptose foi de 3,2%, sendo 0,2% referente ao processo de necrose (Figura 28B). Ao analisar as populações de plaquetas após a IFD, a viabilidade foi de 95,9% e o índice de apoptose foi de 3,4%, sendo 0,5% o valor referente à necrose (Figura 28C). No entanto, esses valores de necrose não são reais para estas células, uma vez que as plaquetas não possuem núcleo e, por esse motivo, não poderiam ser marcadas pelo iodeto de propídeo. Assim, esse valor de necrose provavelmente está relacionado à interferência da fluorescência do Photogem®, que foi lida no mesmo canal da fluorescência do iodeto de propídeo, indicando um artefato de técnica. Assim, nas condições avaliadas a IFD não causou danos a estes fragmentos celulares já que tanto os resultados dos grupos controle do FS quanto os do grupo IFD se assemelham aos encontrados para as plaquetas do grupo controle.

Figura 28 - Ensaio de citometria de fluxo evidenciando os *dot plots* com as porcentagens de viabilidade das plaquetas nas condições: (A) controle, (B) controle do Photogem® FS = 50 µg/mL e (C) IFD com Photogem® FS = 50 µg/mL e fluência $L = 15 \text{ J/cm}^2$ (630 nm).



Fonte: Elaborada pela autora.

Estes resultados relacionam-se com os resultados encontrados na inativação de *S. aureus* na presença do plasma rico em plaquetas, pois neste caso, como as moléculas do FS interagem com as proteínas do plasma, não ficam disponíveis para se ligarem às bactérias ou às membranas das plaquetas e, com isso, não inativam o micro-organismo, mas também não danificam as plaquetas.

5.4 Conclusões parciais

- A IFD inativou a bactéria Gram-positiva *S. aureus* em PBS, com redução total na condição 30 J/cm² e 50 µg/mL para ambos FS e reduções de 7,2 e 7,3 log₁₀ UFC/mL usando Photogem® e Photodithazine®, respectivamente, na condição 15 J/cm² e 50 µg/mL;
- Em sangue total, foi possível reduzir 1 log₁₀ UFC/mL de *S. aureus* na condição 15 J/cm² e 50 µg/mL de Photogem® e Photodithazine®, o que evidencia a dificuldade de inativação da bactéria neste ambiente;
- Foi possível reduzir 1,3 log₁₀ UFC/mL de *S. aureus* na presença dos eritrócitos, na condição 15 J/cm² e 50 µg/mL de Photogem®, e 0,4 log₁₀ UFC/mL de *S. aureus* na presença de plasma rico em plaquetas, na mesma condição;
- Tanto os FSs nas concentrações testadas quanto a luz nos comprimentos de onda 630 e 660 nm nas fluências testadas não apresentaram toxicidade para *S. aureus*, sangue total, eritrócitos e plasma rico em plaquetas;
- A IFD com Photogem® causou menor porcentagem de hemólise (10,7%) nos eritrócitos em sangue total na condição 15 J/cm² e 50 µg/mL quando comparada ao Photodithazine® (55,7%), na mesma condição;
- Quanto às análises quantitativa e qualitativa do sangue total após a IFD com Photogem®, os resultados dos hemogramas e dos esfregaços sanguíneos mostraram-se normais quando comparados aos valores padrões de referência;
- No entanto, quando a IFD com Photogem® foi realizada nos eritrócitos isolados, causou 100% de hemólise, indicando que o plasma possui, de fato, um efeito protetor sobre estas células;
- A análise da interação do Photogem® com o sangue mostrou que o FS foi identificado nos dois hemocomponentes, porém interagiu mais com o plasma. E na ausência do plasma o FS acumulou-se, preferencialmente, na membrana dos eritrócitos;
- Por fim, o ensaio de viabilidade celular mostrou elevados índices de apoptose nos eritrócitos após a IFD com Photogem® na condição 15 J/cm² e 50 µg/mL, indicando toxicidade da técnica nestas células. Contudo, nas plaquetas os índices de apoptose foram baixos, o que sugere possível aplicação da IFD como uma técnica alternativa na descontaminação deste hemocomponente.

6 CAPÍTULO 2 - DESCONTAMINAÇÃO ULTRAVIOLETA DO SANGUE

Neste capítulo são apresentados os objetivos específicos, bem como os resultados, discussões e conclusões parciais relacionados aos experimentos de descontaminação por luz ultravioleta C de *S. aureus* em sangue total e nos hemocomponentes.

6.1 Objetivos Específicos

Avaliar a eficácia *in vitro* da descontaminação por luz UVC no comprimento de onda 254 nm sobre a bactéria Gram-positiva *S. aureus*.

Avaliar a eficácia *in vitro* da descontaminação por luz UVC sobre *S. aureus* em sangue total, em eritrócitos e em plasma rico em plaquetas.

Avaliar as taxas de viabilidade dos eritrócitos e plaquetas após a descontaminação por luz UVC por meio de ensaios de citometria de fluxo.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Amostras de sangue

Amostras de sangue humano foram doadas, voluntariamente, pela própria pesquisadora. As coletas foram realizadas em tubos de coleta de sangue de tampa roxa (BD Vacutainer®) contendo anticoagulante EDTA K2 7,2 mg jateado na parede interna do tubo. O EDTA K2 é o anticoagulante mais recomendado para uso em análises hematológicas por ser o melhor em preservar a morfologia celular e as características físico-químicas das células do sangue, evitando alterações nas amostras extraídas. Imediatamente após a coleta, os tubos eram homogeneizados, cuidadosamente, por inversão de 5 a 8 vezes para evitar a hemólise e a coagulação do sangue.

6.2.2 Cultivo do micro-organismo

Os experimentos foram realizados com o micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), bactéria Gram-positiva. A cepa foi mantida em caldo tripton de soja (TSB, do inglês *Tryptic Soy Broth*) com 20% de glicerol e foi armazenada em criotubos congelados a -4°C. Para o preparo do inóculo, 1 mL da bactéria mantida em congelador foi transferido para tubo cônico tipo Falcon esterilizado contendo 9 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e, após homogeneização da amostra, o tubo foi mantido sob agitação por 15 horas à 37°C. Após esse tempo, o tubo contendo a bactéria foi lavado 2 vezes com solução tampão fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*) por meio de centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos. Após o procedimento, diluições em PBS foram realizadas e a densidade da suspensão foi medida no espectrofotômetro (Cary® 50 Bio UV-Vis, Varian, Austrália) no comprimento de onda 600 nm para obtenção do inóculo a uma concentração de 10^7 a 10^8 UFC/mL, aproximadamente.

6.2.3 Fonte de luz

Para irradiação das amostras foi utilizado um equipamento denominados *Surface UV* (MMOptics, São Carlos/SP), desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT) do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos (Patente: BR 20 2014 006540-2). O

Surface UV (Figura 29) é composto por uma lâmpada que emite radiação UVC no comprimento de onda 254 nm, com irradiância de 13 mW/cm² quando utilizado a 1 cm de distância das amostras. Para os experimentos de inativação do *S. aureus* no sangue total e nos hemocomponentes foram utilizados os seguintes tempos de irradiação: 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 minutos. As fluências correspondentes aos tempos de irradiação são mostradas na Tabela 3.

Figura 29 - Foto ilustrativa do equipamento Surface UV, composto por uma lâmpada que emite radiação UVC no comprimento de onda 254 nm.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3 - Parâmetros avaliados na descontaminação do sangue total e dos hemocomponentes por radiação UVC, no comprimento de onda 254 nm.

| Intensidade | Tempo de irradiação | Fluência |
|-----------------------|----------------------|------------------------|
| 13 mW/cm ² | 0 | 0 |
| | 3 min | 2,3 J/cm ² |
| | 6 min | 4,7 J/cm ² |
| | 9 min | 7 J/cm ² |
| | 12 min | 9,4 J/cm ² |
| | 15 min | 12 J/cm ² |
| | 18 min | 14 J/cm ² |
| | 21 min | 16,4 J/cm ² |
| | 24 min | 19 J/cm ² |
| | 27 min | 21 J/cm ² |
| 30 min | 23 J/cm ² | |

Fonte: Elaborada pela autora.

6.2.4 Descontaminação UVC de *S. aureus* em PBS, em sangue e em hemocomponentes

Os grupos experimentais estudados foram o controle, que não recebeu a radiação UVC, e os grupos irradiados que foram expostos à radiação UVC nos diferentes tempos de escolha. Os experimentos foram realizados em placas multipoços com 24 poços, nos quais foram adicionados 400 µL do inóculo tanto para o grupo controle quanto para os grupos irradiados.

Alíquotas de 10 µL foram retiradas das amostras a cada 3 minutos de irradiação e transferidas para microtubos de centrífuga contendo 990 µL de PBS esterilizado, seguido de diluições decimais até 10^{-5} . Placas de Petri contendo ágar BHI foram divididas em seis partes iguais, sendo que cada parte recebeu 17 µL de cada diluição plaqueados pelo método de espalhamento. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas para posterior contagem das UFC/mL.

Para os experimentos de descontaminação de *S. aureus* em sangue total foi seguido o mesmo desenho experimental descrito. A diferença é que nestes experimentos o microorganismo foi ressuspenso em sangue total ao invés de ser em PBS. Já para os experimentos de descontaminação de *S. aureus* nos hemocomponentes, o sangue total foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos para a separação do sangue em eritrócitos e em plasma rico em plaquetas e, após a centrifugação, cada hemocomponente foi contaminado com *S. aureus*, sendo aplicado o mesmo desenho experimental descrito. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes.

6.2.5 Absorção UV-VIS do plasma rico em plaquetas

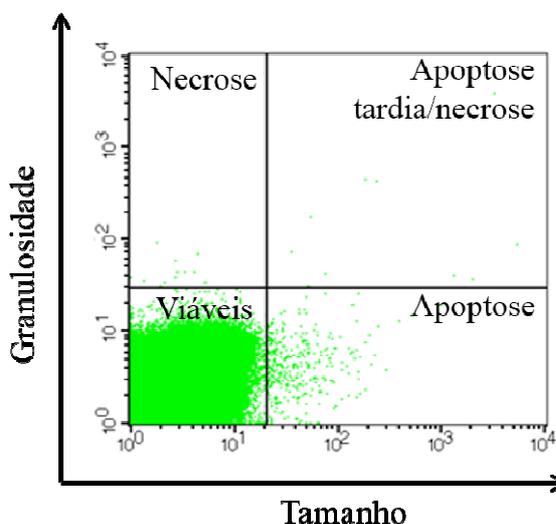
Este estudo foi conduzido para analisar o plasma rico em plaquetas através da espectroscopia de absorção UV-VIS (Cary® 50 Bio, Varian, Austrália) após descontaminação do hemocomponente com a radiação UVC. Para isso, o mesmo volume (400 µL) de plasma sanguíneo utilizado nos experimentos de descontaminação foi adicionado em poços da placa de 24 poços e as amostras foram irradiadas por 30 minutos, nas mesmas condições dos experimentos de descontaminação. As medidas no espectrofotômetro foram realizadas a cada 6 minutos por um período de 30 minutos.

6.2.6 Ensaio de viabilidade celular

Para determinar os índices de viabilidade dos eritrócitos e das plaquetas presentes no plasma sanguíneo após a aplicação da radiação UVC foram realizados experimentos no Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da UNESP de Botucatu (colaboração estabelecida com a Prof^a. Dr^a. Elenice Deffune). Para isso, foram utilizados dois reagentes: Anexina V-FITC e iodeto de propídeo (Kit BD Pharmingen®). A marcação das células seguiu especificações do fabricante, com leitura no equipamento citômetro de fluxo FACSCalibur BD® e análise em software PAINT-A-GATE da BD®. A Anexina V é uma proteína Ca^{2+} dependente que tem elevada afinidade por fosfatidilserinas, que são fosfolípidios internos da membrana expressos somente nos casos de apoptose. O iodeto de propídeo (PI) é utilizado para diferenciar células intactas das não intactas. As células intactas excluem o PI enquanto as células mortas são permeáveis ao reagente.

A leitura dos resultados pelo software CellQuest da BD® foi gerada em *dot plot*, cuja distribuição das células analisadas é feita por quadrante (Figura 30). Assim, as células viáveis que não expressam Anexina V nem PI são identificadas no quadrante inferior esquerdo. As células em apoptose expressam Anexina V, mas não expressam PI e são identificadas no quadrante inferior direito. Já as células em apoptose tardia que começam a coexpressar o PI são identificadas no quadrante superior direito, enquanto as células em necrose, que expressam Anexina V e PI são identificadas no quadrante superior esquerdo.

Figura 30 - Representação esquemática da análise da distribuição das células marcadas com Anexina V e iodeto de propídeo pelos quadrantes do *dot plot* gerado na citometria de fluxo.



6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 UVC em *S. aureus* em PBS

Os resultados da avaliação da eficácia *in vitro* da descontaminação por luz UVC no comprimento de onda 254 nm sobre *S. aureus*, em PBS, são mostrados na Tabela 4. De acordo com a tabela, observa-se que após 1 minuto de irradiação (0,78 J/cm²) foi possível inativar 6,5 log₁₀ UFC/mL de *S. aureus* em PBS. Esse resultado indica eficácia da radiação UVC quando aplicada em micro-organismos que se apresentam em suspensões planctônicas.

Tabela 4 - Log (UFC/mL) da sobrevivência de *S. aureus* em PBS após irradiação com luz UVC (254 nm) nos tempos 0, 1, 3 e minutos. Os valores expressam a média e o desvio padrão para cada tempo de irradiação.

| Tempo de irradiação (minutos) | Log ₁₀ (UFC/mL) |
|-------------------------------|----------------------------|
| 0 | 7,2 ± 0,1 |
| 1 | 0,7 ± 0,9 |
| 3 | < 100 |
| 6 | < 100 |

Fonte: Elaborada pela autora.

Este resultado já era esperado uma vez que o efeito germicida da luz UVC é bem conhecido na literatura. Essa radiação é a mais deletéria e a que mais possui ação germicida, principalmente na faixa de comprimento de onda entre 200 e 280 nm, que corresponde à faixa da radiação UVC, responsável por promover danos fotoquímicos que ocorrem imediatamente no material genético dos micro-organismos.

Outro estudo realizado com este mesmo equipamento mostrou resultados eficazes na inativação de sete diferentes espécies de micro-organismos. Os autores comprovaram a ação do equipamento *Surface UV* na inativação de três bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus pneumoniae*), três bactérias Gram-negativas (duas cepas distintas de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e um fungo leveduriforme (*Candida albicans*). Todos os micro-organismos foram irradiados com UVC em suspensões planctônicas por 1 minuto, que correspondeu à fluência de 0,78 J/cm². As

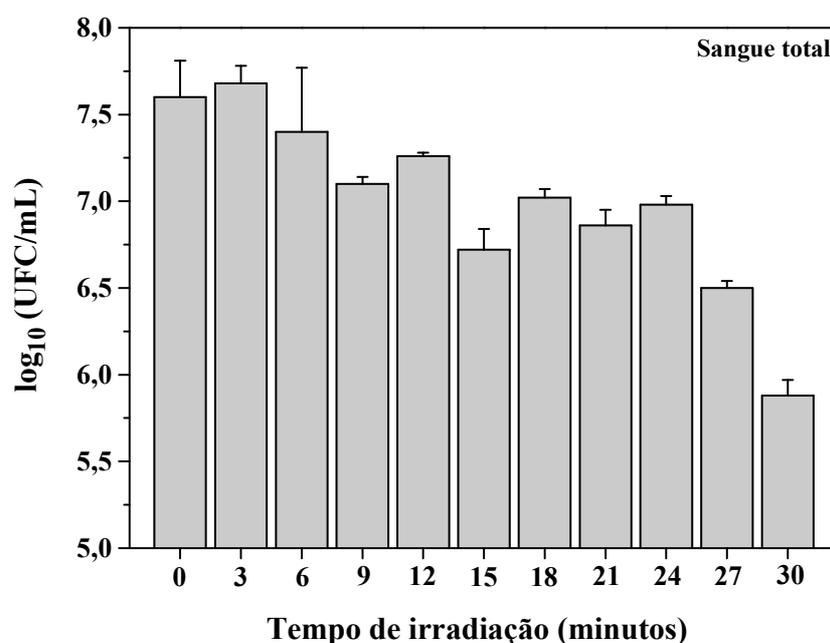
reduções obtidas foram de 6,5 log₁₀ para *S. aureus*, 6,7 log₁₀ para *S. mutans*, 6,2 log₁₀ para *S. pneumoniae*, 5,4 log₁₀ para *E. coli*, 5,2 log₁₀ para *E. coli* (ATCC 8739), 5,4 log₁₀ para *P. aeruginosa* e 6,7 log₁₀ para *C. albicans*. (100)

Com base neste estudo, novos tempos de irradiação foram avaliados em *S. aureus* na presença de sangue total. O aumento no tempo de irradiação justifica-se pelo fato do sangue ser um meio rico em moléculas e de elevada complexidade, no qual a inativação poderia não ocorrer com apenas 1 minuto de irradiação.

6.3.2 UVC em *S. aureus* em sangue total

Para avaliar a eficácia *in vitro* da descontaminação por luz UVC sobre *S. aureus* em sangue total, o micro-organismo foi resuspenso em sangue e as amostras foram submetidas à diferentes tempos de irradiação. Na Figura 31 são mostrados os resultados de inativação de *S. aureus* nos tempos de irradiação: 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 minutos.

Figura 31 - Sobrevivência de *S. aureus* em sangue total após irradiação com luz UVC (254 nm) em função do tempo de irradiação (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 minutos). Os valores expressam a média e o desvio padrão.



Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com a análise do gráfico apresentado observa-se redução de 1,7 log₁₀ para *S. aureus* em sangue total no maior tempo de irradiação (30 minutos), que correspondeu à fluência 23 J/cm². Apesar da alta fluência aplicada, a inativação não se mostrou satisfatória quando comparada à inativação de *S. aureus* em PBS com apenas 0,78 J/cm². E esse resultado pode ser explicado pela dispersão que a radiação UVC pode ter sofrido nesse meio, uma vez que a variedade de moléculas presentes no plasma juntamente com a presença dos eritrócitos podem ter dificultado a penetração da luz nos micro-organismos.

Para a realização deste experimento as amostras sanguíneas permaneceram estáticas durante todo o tempo de irradiação e, com a ação da gravidade, grande parte das bactérias provavelmente foi para o fundo dos poços da placa de multipoços. Nesse desenho experimental, e como a irradiação das amostras foi realizada com o equipamento na parte superior dos poços, uma possível justificativa para o baixo índice de inativação pode estar relacionado ao fato da luz não ter atingido os micro-organismos dos níveis mais inferiores.

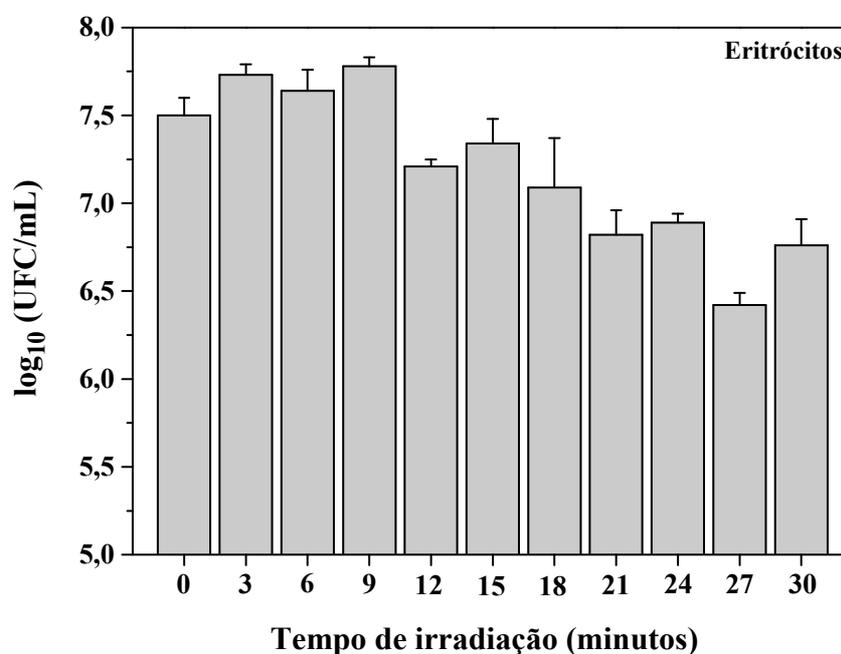
6.3.3 UVC em *S. aureus* em hemocomponentes

Como a inativação de *S. aureus* em sangue total com a radiação UVC também mostrou ser um processo difícil, apresentando menor índice de morte nesta condição, outros experimentos foram realizados no intuito de entender se a inativação do micro-organismo foi prejudicada por algum componente sanguíneo específico. Desse modo, novos experimentos foram delineados nos dois principais hemocomponentes: eritrócitos e plasma rico em plaquetas. Na Figura 32 são apresentados os resultados da sobrevivência de *S. aureus* na presença de eritrócitos após irradiação com luz UVC nos mesmos tempos estabelecidos para o experimento anterior. Os resultados mostram que a inativação do micro-organismo, nos eritrócitos, também não se mostrou eficiente, sendo a redução em torno de 1,1 log₁₀ UFC/mL no tempo de 27 minutos, correspondente à fluência 21 J/cm², que aparentemente, foi o melhor resultado de inativação para as condições avaliadas.

De acordo com esse resultado observa-se que, de fato, a presença dos eritrócitos prejudicou a inativação de *S. aureus*, impedindo que toda a luz pudesse chegar aos micro-organismos. A penetração da radiação UVC é importante para que ocorra o dano e, neste caso, essa penetração foi prejudicada pela presença dos eritrócitos. Outro fator que pode ter contribuído para o baixo índice de inativação foi a ausência de agitação das amostras durante a irradiação, uma vez que a agitação leva a uma mistura das partículas presentes neste

ambiente favorecendo que grande parte do líquido entre em contato com a radiação UVC. Assim, o efeito biológico da radiação UVC nos micro-organismos não é baseado somente na fluência aplicada, mas é também dependente de outras condições, como por exemplo, da exposição da luz, velocidade de agitação, concentração de células, presença de proteínas, sendo que estas duas últimas condições estão diretamente relacionadas com a transparência da solução a ser tratada pela radiação UVC. (127)

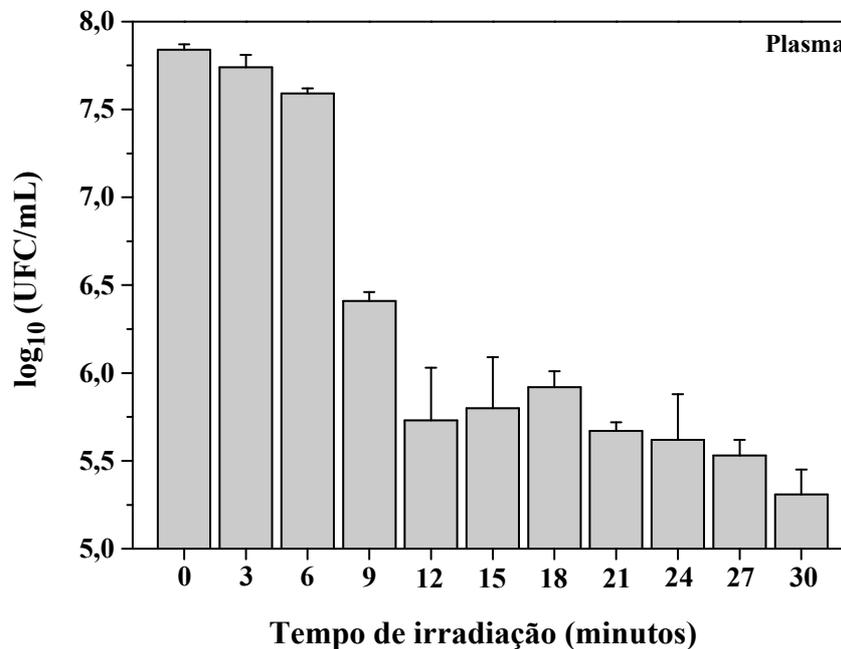
Figura 32 - Sobrevivência de *S. aureus* em eritrócitos após irradiação com luz UVC (254 nm) em função do tempo de irradiação (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 minutos). Os valores expressam a média e o desvio padrão.



Fonte: Elaborada pela autora.

Em relação à inativação do micro-organismo na presença do plasma, os resultados são mostrados na Figura 33. De acordo com o gráfico apresentado, observa-se que a redução de *S. aureus* foi cerca de 2,5 \log_{10} UFC/mL no maior tempo de irradiação (30 minutos), correspondente à fluência 23 J/cm². Estes resultados indicam melhor inativação neste componente sanguíneo quando comparados aos resultados de inativação nos eritrócitos. Assim, o plasma não parece ser o principal componente sanguíneo responsável por dificultar e/ou impedir o processo de inativação da bactéria na presença de sangue total.

Figura 33 - Sobrevivência de *S. aureus* em plasma rico em plaquetas após irradiação com luz UVC (254 nm) em função do tempo de irradiação (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 minutos). Os valores expressam a média e o desvio padrão.



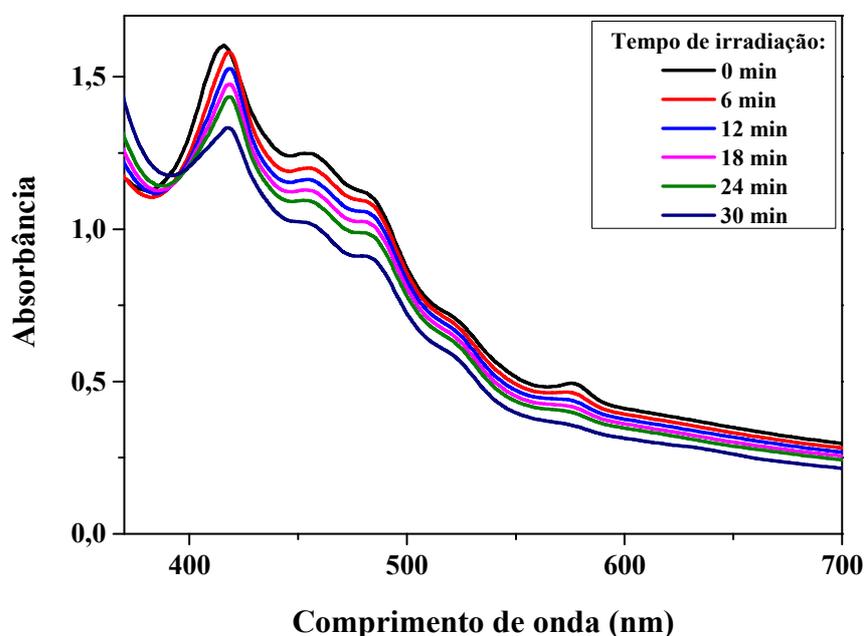
Fonte: Elaborada pela autora.

No entanto, estes resultados diferem de um estudo da literatura (128), que mostrou que uma fluência de 1 J/cm^2 pode ser apropriada para inativar eficientemente os vírus presentes no plasma, além de não interferir na qualidade dos fatores de coagulação, já que as atividades dos fatores de coagulação testados foram reduzidas em aproximadamente 10 a 20% em comparação com o plasma não tratado. Além disso, o plasma tratado nesta condição estava sob agitação, pois segundo os autores, a entrega ideal da radiação UVC é realizada quando a exposição é combinada com a agitação orbital controlada, que leva à formação de áreas com camadas finas expostas à radiação UVC, proporcionando penetração efetiva da luz e um tratamento uniforme. Portanto, a diferença encontrada entre os resultados aqui apresentados e o estudo citado pode estar fortemente relacionada à agitação das amostras durante o processo de irradiação.

6.3.4 Análise do plasma rico em plaquetas após radiação UVC

O estudo da análise do plasma após aplicação da radiação UVC foi conduzido para analisar se o plasma sofreu danos com o emprego da técnica. Assim, medidas realizadas através da espectroscopia de absorção UV-VIS (Cary® 50 Bio, Varian, Austrália) foram realizadas a cada 6 minutos por um período de 30 minutos, tempo total de irradiação das amostras. Os resultados com os espectros de absorção do plasma são mostrados na Figura 34.

Figura 34 - Espectros de absorção do plasma rico em plaquetas após irradiação com luz UVC (254 nm) nos tempos de irradiação: 0, 6, 12, 18, 24 e 30 minutos.



Fonte: Elaborada pela autora.

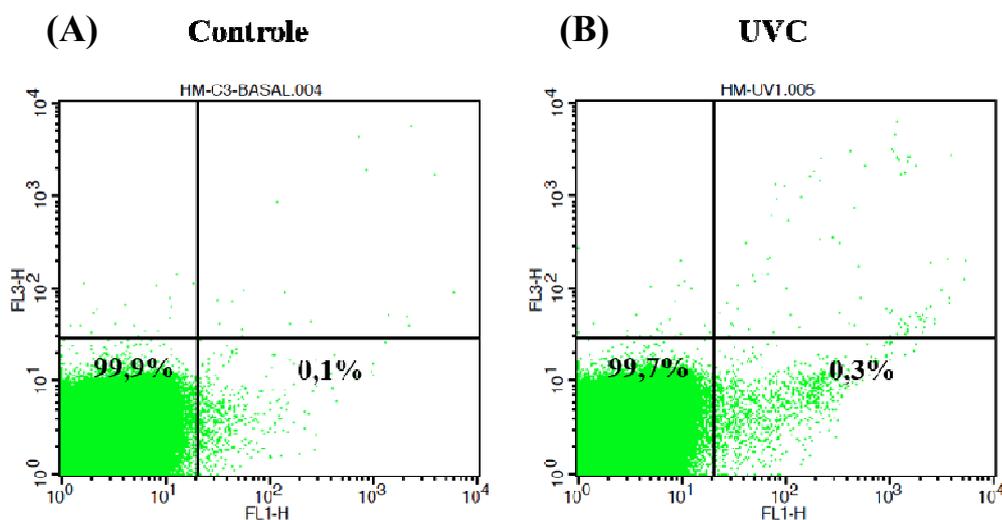
De acordo com os espectros, é possível observar uma pequena redução da absorção do plasma em função do tempo de irradiação das amostras pela luz UVC. Tais resultados podem informar que a exposição à radiação UVC talvez esteja danificando alguma proteína do plasma, no entanto, todos os picos mostrados no tempo de irradiação zero são observados nos outros tempos de irradiação, o que sugere a não degradação das proteínas plasmáticas, mas uma provável perda em sua concentração inicial. Estes resultados estão de acordo com um outro estudo que avaliou as proteínas do plasma após o processo de irradiação com UVC.

Mohr e colaboradores (2009) avaliaram a qualidade *in vitro* das proteínas plasmáticas após a irradiação com UVC e observaram que a qualidade do plasma é moderadamente influenciada pelo tratamento com UVC. Segundo os autores, após irradiação com fluência de 1 J/cm^2 , as atividades dos fatores de coagulação testados foram reduzidas em 10 a 20% em comparação com o plasma não tratado, sendo o XI o fator de coagulação mais sensível ao efeito da radiação UVC, cuja atividade foi perdida em aproximadamente 23%. (128) Apesar das reduções encontradas, os componentes plasmáticos avaliados não foram totalmente degradados durante o processo de inativação por radiação UVC, isto é, na fluência estudada houve perda de aproximadamente 20% dos fatores de coagulação avaliados.

6.3.5 Análise da viabilidade dos eritrócitos e das plaquetas após radiação UVC

Com o intuito de analisar a viabilidade dos eritrócitos e das plaquetas após os experimentos de descontaminação por radiação UVC, novos experimentos foram conduzidos no Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da UNESP de Botucatu. Os resultados dos índices de viabilidade para os eritrócitos são mostrados na Figura 35.

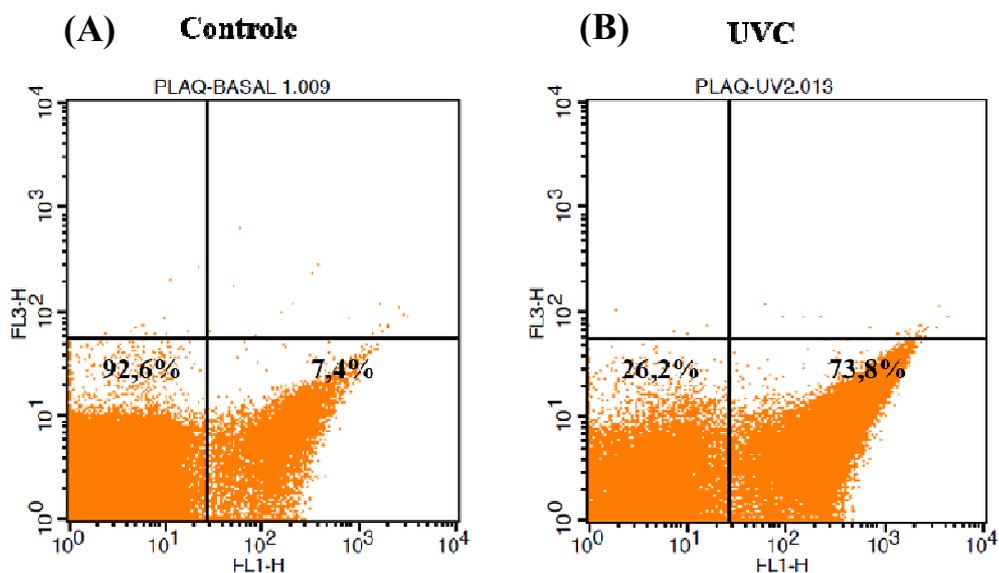
Figura 35 - Ensaio de citometria de fluxo evidenciando os *dot plots* com as porcentagens de viabilidade dos eritrócitos nas condições: (A) controle e (B) irradiação com luz UVC (254 nm) no maior tempo de irradiação (30 minutos).



Fonte: Elaborada pela autora.

Inicialmente, para os eritrócitos foram lidos 2.026.899 eventos dos quais, no *gate* delimitado como área correspondente aos eritrócitos de padrão normal, 1.183.073 foram identificados, sendo estas células correspondentes ao grupo controle. Para as análises dos eritrócitos do grupo controle, a viabilidade foi de 99,9% sendo mínimo o índice de apoptose (0,1%). Já para os eritrócitos que receberam irradiação UVC, apenas o maior tempo (30 minutos) de irradiação foi analisado. Portanto, para este grupo a viabilidade dos eritrócitos foi de 99,7% e o índice de apoptose foi de 0,3%. Estes resultados indicam que a radiação UVC não causou danos às células, confirmando a baixa absorção da luz pela hemoglobina frente a esse comprimento de onda. Em relação à análise das plaquetas, os resultados dos índices de viabilidade, bem como de apoptose são mostrados na Figura 36.

Figura 36 - Ensaio de citometria de fluxo evidenciando os *dot plots* com as porcentagens de viabilidade das plaquetas nas condições: (A) controle e (B) irradiação com luz UVC (254 nm) no maior tempo de irradiação (30 minutos).



Fonte: Elaborada pela autora.

Para as plaquetas foram lidos 200.000 eventos dos quais, no *gate* delimitado como área correspondente às plaquetas de padrão normal, 122.696 foram identificados, sendo estes os fragmentos de células correspondentes ao controle. Assim, para as plaquetas do grupo controle, a viabilidade foi de 92,6% e o índice de apoptose foi de 7,4%, que corresponde a um grau de apoptose natural das plaquetas. Quanto às plaquetas que receberam radiação UVC no

tempo de 30 minutos, a viabilidade foi de 26,2% e o índice de apoptose foi de 73,8%, indicando que a radiação UVC foi extremamente agressiva às plaquetas pois causou sérios danos a estes fragmentos celulares, uma vez que a viabilidade foi reduzida. Com isso, conclui-se que a luz UVC, apesar de ter indicado redução microbiana de 2,5 log₁₀ UFC/mL no plasma rico em plaquetas, não é a melhor opção de descontaminação neste componente sanguíneo uma vez que foi muito agressiva.

6.4 Conclusões parciais

- A radiação UVC (254 nm) inativou a bactéria Gram-positiva *S. aureus* em PBS, com redução de 6,5 log₁₀ UFC/mL em 1 minuto de irradiação, que corresponde à fluência 0,78 J/cm²;
- Em sangue total, a redução de *S. aureus* foi de 1,7 log₁₀ UFC/mL no maior tempo de irradiação, isto é, com 30 minutos de exposição à luz, correspondente à fluência 23 J/cm², o que evidencia a dificuldade de inativação da bactéria neste sistema;
- Nos hemocomponentes, a redução de *S. aureus* foi de 1,1 log₁₀ UFC/mL na presença dos eritrócitos, com 27 minutos de exposição à luz, correspondente à fluência 21 J/cm², e de 2,5 log₁₀ UFC/mL na presença de plasma rico em plaquetas, com 30 minutos de exposição à luz e fluência 23 J/cm²;
- Foi observada pequena redução na absorção do plasma em função do tempo de irradiação das amostras pela luz UVC, sugerindo pouca degradação das proteínas do plasma após 30 minutos de irradiação (23 J/cm²);
- Por fim, o ensaio de viabilidade celular mostrou índices normais de viabilidade nos eritrócitos após 30 minutos de irradiação UVC, sugerindo ausência de dano nestas células. Contudo, nas plaquetas, elevado índice de apoptose (73,8%) foi encontrado, o que indica danos a estes fragmentos celulares no maior tempo de irradiação.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sangue é considerado um fluido vital para a manutenção da vida e um recurso muito importante na medicina. Para otimizar seu uso, o sangue total passa por processos físicos de centrifugação para sua separação em concentrados de eritrócitos, concentrados de plaquetas, plasma fresco congelado e crioprecipitado. No entanto, e por qualquer descuido no processo de armazenamento, esses componentes sanguíneos podem se tornar alvos de contaminação.

Qualquer hemocomponente, e até mesmo o sangue total, tem o potencial de transportar micro-organismos patogênicos. Devido a essa problemática é importante que tratamentos eficazes sejam estudados com a finalidade de serem aplicados em sangue para inativar a maior parte dos agentes infecciosos, sem causar danos aos componentes celulares e às moléculas presentes no plasma sanguíneo. Porém, encontrar técnicas que permitam a descontaminação do sangue sem danificar seus constituintes não tem sido uma tarefa simples.

Um dos fatores que complicam esse processo está relacionado à própria composição do sangue, ou seja, ao plasma que é uma suspensão de proteínas e plaquetas, e aos eritrócitos que são células sensíveis a qualquer mudança provocada no meio. Assim, tanto o sangue total quanto os hemocomponentes são considerados meios complexos e manter a qualidade destes produtos biológicos após qualquer tratamento ainda tem sido um grande desafio. Outro fator complicador ao processo de controle microbiano no sangue está relacionado aos micro-organismos que se encontram em diferentes locais de acordo com o componente sanguíneo contaminado. Nos eritrócitos e nas plaquetas, por exemplo, os agentes infecciosos podem estar livres, sobrenadando na suspensão celular ou podem localizar-se intra ou extracelularmente. Já no plasma, os micro-organismos permanecem em suspensão.

Embora a aplicação da IFD para inativar principalmente vírus presentes no plasma sanguíneo possa ser realizada eficientemente e com toxicidade controlada, os demais componentes sanguíneos, como eritrócitos e plaquetas, apresentam sérios problemas devido às dificuldades associadas à descontaminação e à absorção intracelular dos FSs e luz, que podem provocar danos na membrana celular. Quando a descontaminação ocorre no sangue total, este problema torna-se ainda maior devido à complexidade do meio e à ausência de seletividade de algumas moléculas de FS ao alvo desejado. Somado a isso, quando os micro-organismos estão presentes no sangue total tornam-se menos susceptíveis à interação com os FSs, que pode ser explicado pela ação bloqueadora das proteínas plasmáticas, cuja presença diminui a atividade dos FSs dificultando a realização da IFD. Essas proteínas do plasma

competem com os micro-organismos pela ligação aos FSs, fazendo com que não haja o rendimento quântico adequado para a eficácia da técnica.

Apesar da IFD ser considerada bem-sucedida na descontaminação de componentes sanguíneos em alguns casos, em outros pode resultar em elevadas porcentagens de hemólise, o que é totalmente indesejado. Essa hemólise pode ser mediada pela ligação do FS à membrana dos eritrócitos que, ao interagir com a luz, promove a ocorrência das reações tóxicas bem próximo às membranas, com consequente morte celular. Assim, qualquer que seja o micro-organismo a ser inativado no sangue, é preciso que ocorra direcionamento e seletividade do FS ao agente patogênico, pois com isso os danos colaterais nas células sanguíneas e nas proteínas plasmáticas podem ser evitados.

Portanto, uma das possibilidades de melhorar os resultados da IFD em sangue é aperfeiçoar essa seletividade conjugando anticorpos específicos às moléculas dos FSs para ocorrer o reconhecimento dos antígenos do alvo e direcionar a inativação. Essa aplicação pode ser uma boa alternativa para eliminar micro-organismos em sangue, pois o dano ocorreria somente nos agentes patogênicos, sem interferência na viabilidade e funcionalidade das células, nem nas propriedades do plasma. Contudo, o desenvolvimento de FSs conjugados a anticorpos específicos a determinado micro-organismo pode ser economicamente inviável, seja pelo desenvolvimento dos anticorpos ou até mesmo pela técnica de depuração desses agentes, que precisam ser removidos das amostras de sangue.

A outra técnica envolvida na descontaminação de sangue abordada neste estudo foi a radiação ultravioleta. Como se sabe, a radiação UVC, por si só, é considerada um potente agente microbicida; no entanto, também pode ser prejudicial a diversos componentes sanguíneos. Alguns estudos têm mostrado que a radiação UVC pode ser uma abordagem alternativa para tratar infecções e também para modular a resposta imunológica utilizada neste caso para normalizar os parâmetros do sangue. (97) A exposição à doses de luz ou fluências baixas é considerada eficiente na inativação de diversas espécies de micro-organismos. Além disso, a exposição de componentes sanguíneos à fluências mínimas de radiação UVC pode trazer benefícios e ser eficientemente utilizada no controle de agentes infecciosos em sangue. No entanto, esses efeitos benéficos podem ser perdidos quando fluências muito altas de radiação UVC são aplicadas para inativar micro-organismos em componentes sanguíneos.

De acordo com os resultados apresentados neste estudo, os relacionados à viabilidade dos eritrócitos e das plaquetas mostraram que as duas técnicas ópticas analisadas (IFD e UVC) mostraram efeitos opostos em cada hemocomponente avaliado. A IFD foi muito tóxica para os eritrócitos, pois apresentou ação destruidora a estas células, enquanto nas plaquetas

não foram observados índices de morte celular, o que sugere sua possível aplicação como técnica alternativa na descontaminação deste hemocomponente. A radiação UVC, em contrapartida, mostrou-se muito tóxica para as plaquetas, nas quais foram observados elevados índices de apoptose, enquanto nos eritrócitos a viabilidade e funcionalidade foram mantidas. Estes resultados são interessantes uma vez que, dependendo do alvo que se quer descontaminar, o emprego de uma ou outra técnica deverá ser avaliado juntamente com as melhores condições de inativação microbiana e de preservação dos componentes sanguíneos, para garantir o controle microbiológico de sangue.

8 CONCLUSÕES

O presente estudo avaliou a possibilidade de descontaminação *in vitro* do sangue total e dos hemocomponentes por duas técnicas ópticas, a IFD e a radiação UVC. O princípio de inativação de micro-organismos por radiação UVC (254 nm) parece ser o mais indicado para o desenvolvimento de um sistema automatizado de descontaminação de sangue quando comparado à IFD com o FS Photogem® associado à luz (630 nm). Com apenas um minuto de irradiação com a luz UVC (0,78 J/cm²) foi possível inativar 6,5 log₁₀ UFC/mL da bactéria Gram-positiva *S. aureus* em PBS e os resultados de inativação da bactéria em sangue podem ser melhorados se o processo ocorrer em um sistema de fluxo contínuo.

Assim, para que as taxas de inativação dos micro-organismos sejam mantidas elevadas juntamente com a preservação dos constituintes do sangue, um novo sistema deverá ser desenvolvido, no qual será possível realizar a separação dos hemocomponentes e preservá-los, sendo exposto à radiação apenas um líquido que estará circulando em fluxo contínuo, carreando os alvos a serem destruídos por irradiação UVC controlada.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para o futuro, existe a necessidade de direcionar a inativação dos micro-organismos, evitando os danos ocasionados nas células sanguíneas, bem como nos componentes do plasma, para garantir que todos os componentes do sangue e suas funções mantenham-se preservadas. Para alcançar estes objetivos, um sistema automatizado utilizando o princípio de inativação por radiação UVC está em fase de desenvolvimento para que os componentes sanguíneos sejam descontaminados em fluxo contínuo e em condições controladas.

REFERÊNCIAS

- 1 Uppu, D.S.S.M.; Ghosh, C.; et al. Surviving sepsis in the era of antibiotic resistance: are there any alternative approaches to antibiotic therapy? **Microbial Pathogenesis**, v. 80, p. 7–13, 2015.
 - 2 Instituto Latino-Americano para Estudos da Sepse. **Sepse: um problema de saúde pública**. Brasília: Conselho Federal de Medicina, 2015.
 - 3 Angus, D.C.; Poll, T. Severe sepsis and septic shock. **The New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 9, p. 840–51, 2013.
 - 4 Anas, A.A.; Wiersinga, W.J.; et al. Recent insights into the pathogenesis of bacterial sepsis. **Netherlands Journal of Medicine**, v. 68, n. 4, p. 147–152, 2010.
 - 5 World Health Organization. **Global action plan on antimicrobial resistance**. Geneva: WHO, 2015.
 - 6 Lee, C.K.; Ho, P.L.; et al. Impact of donor arm skin disinfection on the bacterial contamination rate of platelet concentrates. **Vox Sanguinis**, v. 83, n. 3, p. 204–208, 2002.
 - 7 Brecher, M.E.; Hay, S.N. Bacterial contamination of blood components. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 1, p. 195–204, 2005.
 - 8 Brecher, M.E.; Means, N.; et al. Evaluation of an automated culture system for detecting bacterial contamination of platelets: an analysis with 15 contaminating organisms. **Transfusion**, v. 41, n. 4, p. 477–482, 2001.
 - 9 Hillyer, C.D.; Josephson, C.D.; et al. Bacterial contamination of blood components: risks, strategies, and regulation. **American Society of Hematology**, n. 1, p. 575–589, 2003.
 - 10 Brecher, M.E.; Holland, P. V.; et al. Growth of bacteria in inoculated platelets: Implications for bacteria detection and the extension of platelet storage. **Transfusion**, v. 40, n. 11, p. 1308–1312, 2000.
 - 11 Romanelli, R.M.; Anchieta, L.M.; et al. Risk factors and lethality of laboratory-confirmed bloodstream infection caused by non-skin contaminant pathogens in neonates. **Jornal de Pediatria**, v. 89, n. 2, p. 189–196, 2013.
 - 12 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **3º Boletim Anual de Produção Hemoterápica**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013.
 - 13 Brasil. Ministério da Saúde. **Guia para o uso de hemocomponentes**. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada, 2008.
-

-
- 14 Casteel, M.J.; Jayaraj, K.; et al. Photoinactivation of hepatitis A virus by synthetic porphyrins. **Photochemistry and Photobiology**, v. 80, n. 2, p. 294–300, 2004.
- 15 Wainwright, M. Pathogen inactivation in blood products. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 127–143, 2002.
- 16 Liumbruno, G.M.; Catalano, L.; et al. Reduction of the risk of bacterial contamination of blood components through diversion of the first part of the donation of blood and blood components. **Blood Transfusion**, v. 7, n. 2, p. 86–93, 2009.
- 17 Singh, G.; Sehgal, R. Transfusion-transmitted parasitic infections. **Asian Journal of Transfusion Science**, v. 4, n. 2, p. 73–77, 2010.
- 18 Lobo, C.A.; Cursino-Santos, J.R.; et al. Babesia: An emerging infectious threat in transfusion medicine. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 7, p. 9–11, 2013.
- 19 Burnouf, T.; Radosevich, M. Reducing the risk of infection from plasma products: specific preventative strategies. **Blood Reviews**, v. 14, n. 2, p. 94–110, 2000.
- 20 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Serviços de hemoterapia: relatórios de produção**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2016.
- 21 Junqueira, L.C., Carneiro, J. Células do sangue. In: **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, p. 217–232.
- 22 Souza, M.H.L., Elias, D.O. Fisiologia do sangue. In: **Fundamentos da circulação extracorpórea**. Rio de Janeiro: Centro Editorial Alfa Rio, 2006, p. 103–138.
- 23 Orkin, S.H.; Zon, L.I. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 631–644, 2008.
- 24 Organização Mundial da Saúde **O uso clínico do sangue na medicina, obstetrícia, pediatria e neonatologia, cirurgia e anestesia, traumas e queimaduras**. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2003.
- 25 Yawata, Y. Composition of normal red cell membranes. In: **Cell Membrane: The red blood cell as a model**. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003, p. 27–46.
- 26 Kratz, F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 132, n. 3, p. 171–183, 2008.
- 27 Roche, M.; Rondeau, P.; et al. The antioxidant properties of serum albumin. **FEBS Letters**, v. 582, n. 13, p. 1783–1787, 2008.
-

-
- 28 Liunbruno, G.; Bennardello, F.; et al. Recommendations for the transfusion of red blood cells. **Blood Transfusion**, v. 7, n. 1, p. 49–64, 2009.
- 29 Murphy, M.F.; Wallington, T.B.; et al. Guidelines for the clinical use of red cell transfusions. **British Journal of Haematology**, v. 113, n. 1, p. 24–31, 2001.
- 30 Greening, D.W.; Glenister, K.M.; et al. International blood collection and storage: Clinical use of blood products. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 3, p. 386–395, 2010.
- 31 Wainwright, M. Methylene blue derivatives - suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, n. 4, p. 381–394, 2000.
- 32 Karchmer, A.W. Bloodstream infections: the problem and the challenge. **International journal of antimicrobial agents**, v. 34, p. S2–S4, 2009.
- 33 Araujo, M.R.E. Hemoculturas: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. **Journal of Infection Control**, v. 1, n. 1, p. 8–19, 2012.
- 34 Viscoli, C. Bloodstream infections: The peak of the iceberg. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 248–251, 2016.
- 35 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Infecção de Corrente Sanguínea. Orientações para Prevenção de Infecção Primária de Corrente Sanguínea**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.
- 36 Akova, M. Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 252–266, 2016.
- 37 Tortora, G.J.; Funke, B.R.; et al. **Microbiologia**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2012.
- 38 Lowy, F.D. Staphylococcus aureus infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520–532, 1998.
- 39 Sulaiman, I.M.; Banerjee, P.; et al. Rapid detection of Staphylococcus aureus and related species isolated from food, environment, cosmetics, a medical device, and clinical samples using the VITEK MS Microbial Identification System. **Journal of AOAC International**, 2017.
- 40 Tong, S.Y.C.; Davis, J.S.; et al. Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015.
- 41 Kaasch, A.J.; Barlow, G.; et al. Staphylococcus aureus bloodstream infection: A pooled analysis of five prospective, observational studies. **Journal of Infection**, v. 68, n. 3, p. 242–251, 2014.
-

-
- 42 Rhee, Y.; Aroutcheva, A.; et al. Evolving epidemiology of *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 36, n. 12, p. 1417–22, 2015.
- 43 Laupland, K.B.; Lyytikäinen, O.; et al. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: A multinational population-based surveillance study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 5, p. 465–471, 2013.
- 44 Vogel, M.; Schmitz, R.P.H.; et al. Infectious disease consultation for *Staphylococcus aureus* bacteremia – A systematic review and meta-analysis. **Journal of Infection**, v. 72, n. 1, p. 19–28, 2016.
- 45 Asgeirsson, H.; Kristjansson, M.; et al. Clinical significance of *Staphylococcus aureus* bacteriuria in a nationwide study of adults with *S. aureus* bacteraemia. **Journal of Infection**, v. 64, n. 1, p. 41–46, 2012.
- 46 Allison, R.R.; Moghissi, K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. **Clinical Endoscopy**, v. 46, n. 1, p. 24–29, 2013.
- 47 Allison, R.R.; Bagnato, V.S.; et al. Future of oncologic photodynamic therapy. **Future oncology (London, England)**, v. 6, n. 6, p. 929–940, 2010.
- 48 Allison, R.R.; Sibata, C.H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 7, n. 2, p. 61–75, 2010.
- 49 Kharkwal, G.B.; Sharma, S.K.; et al. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. **Laser in surgery and medicine**, v. 43, n. 7, p. 755–767, 2011.
- 50 Maisch, T.; Hackbarth, S.; et al. Photodynamic inactivation of multi-resistant bacteria (PIB) - a new approach to treat superficial infections in the 21st century. **Journal of the German Society of Dermatology: JDDG**, v. 9, n. 5, p. 360–366, 2010.
- 51 Maisch, T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. **Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 974–983, 2009.
- 52 Panhóca, V.H.; Luis Esteban Florez, F.; et al. Oral decontamination of orthodontic patients using photodynamic therapy mediated by blue-light irradiation and curcumin associated with sodium dodecyl sulfate. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 34, n. 9, p. 411–417, 2016.
- 53 Silva, A.P. da; Kurachi, C.; et al. Fast elimination of onychomycosis by hematoporphyrin derivative-photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 3, p. 328–330, 2013.
- 54 Silva, A.P. da; Chiandrone, D.J.; et al. Development and comparison of two devices for treatment of onychomycosis by photodynamic therapy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 20, n. 6, p. 61109, 2015.
-

-
- 55 Paula da Silva, A.; Carbinatto, F.M.; et al. A Promising strategy for the treatment of onychomycosis with curcumin and photodynamic therapy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 3, p. 434–437, 2015.
- 56 Blanco, K.C.; Inada, N.M.; et al. Treatment of recurrent pharyngotonsillitis by photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 138–139, 2017.
- 57 Dovigo, L.N.; Carmello, J.C.; et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p. 243–251, 2012.
- 58 Carmello, J.C.; Dovigo, L.N.; et al. In vivo evaluation of photodynamic inactivation using Photodithazine (R) against *Candida albicans*. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14, n. 7, p. 1319–1328, 2015.
- 59 Hamblin, M.R.; Hasan, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436–450, 2004.
- 60 Huang, L.; Dai, T.; et al. Antimicrobial Photodynamic Inactivation and Photodynamic Therapy for Infections. v. 635, n. 8, p. 155–173, 2010.
- 61 Denis, T.G. St.; Dai, T.; et al. All you need is light: Antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 509–520, 2011.
- 62 Hamblin, M.R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 33, p. 67–73, 2016.
- 63 Kashef, N.; Hamblin, M.R. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? **Drug Resistance Updates**, v. 31, p. 31–42, 2017.
- 64 Huang, L.; Xuan, Y.; et al. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 44, n. 6, p. 490–499, 2012.
- 65 MacDonald, I.J.; Dougherty, T.J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 5, n. 2, p. 105–129, 2001.
- 66 Jori, G.; Fabris, C.; et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, n. 5, p. 468–481, 2006.
- 67 Wilson, B.C.; Patterson, M.S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Physics in Medicine and Biology**, v. 53, n. 9, p. 61–109, 2008.
-

-
- 68 Kessel, D.; Thompson, P. Purification and analysis of hematoporphyrin and hematoporphyrin derivative by gel exclusion and reverse-phase chromatography. **Photochemistry and Photobiology**, v. 46, n. 6, p. 1023–1025, 1987.
- 69 Mironov, A.F.; Nizhnik, A.N.; et al. Hematoporphyrin derivatives: An oligomeric composition study. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 4, n. 3, p. 297–306, 1990.
- 70 Menezes, P.F.C. de Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem® fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser. 182 p. Tese de Doutorado. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2006.
- 71 Giusti, J.S.M.; Santos-Pinto, L.; et al. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 4, p. 281–287, 2008.
- 72 Dovigo, L.N.; Pavarina, A.C.; et al. Photodynamic inactivation of four *Candida* species induced by Photogem. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 42–49, 2010.
- 73 Dovigo, L.N.; Pavarina, A.C.; et al. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Mycoses**, v. 54, n. 2, p. 123–130, 2011.
- 74 Gois, M.M.; Kurachi, C.; et al. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to porphyrin-mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy: An in vitro study. **Lasers in Medical Science**, v. 25, n. 3, p. 391–395, 2010.
- 75 Pires, L.; Bosco, S. de M.G.; et al. Photodynamic therapy for pythiosis. **Veterinary Dermatology**, v. 24, n. 1, p. 130–137, 2013.
- 76 Pires, L.; Bosco, S.D.M.G.; et al. Photodynamic therapy in *Pythium insidiosum* - An in vitro study of the correlation of sensitizer localization and cell death. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.
- 77 Souza, L.M. de, Pratavieira, S., et al. Efficacy of photodynamic therapy against larvae of *Aedes aegypti*: confocal microscopy and fluorescence-lifetime imaging. In: **Proc. SPIE 8947, Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XII**. São Francisco: v.8947.2014,
- 78 Stranadko, E.P., Ponomarev, G. V, et al. The first experience of Photodithazine clinical application for photodynamic therapy of malignant tumors. In: **Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy IX**. v.1.2000, p. 138–144.
-

-
- 79 Privalov, V.; Lappa, A.; et al. Clinical trials of a new chlorin photosensitizer for photodynamic therapy of malignant tumors. **Proceedings of SPIE**, v. 4612, n. 3512, p. 178–189, 2002.
- 80 Correa, J.C.; Bagnato, V.S.; et al. Previous illumination of a water soluble chlorine photosensitizer increases its cytotoxicity. **Laser Physics**, v. 22, n. 9, p. 1387–1394, 2012.
- 81 Corrêa, J.C. Fotodegradação do Photodithazine e citotoxicidade dos fotoprodutos formados após irradiação com laser. 114 p. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2006.
- 82 Quishida, C.C.C.; Oliveira Mima, E.G. de; et al. Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using Photodithazine® and LED light after one and three successive applications. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 9, p. 2303–2312, 2015.
- 83 Dovigo, L.N.; Carmello, J.C.; et al. Photodynamic inactivation of clinical isolates of *Candida* using Photodithazine®. **Biofouling**, v. 29, n. 9, p. 1057–1067, 2013.
- 84 Carmello, J.C.; Alves, F.; et al. Treatment of oral candidiasis using Photodithazine - mediated photodynamic therapy in vivo. **Plos One**, v. 11, n. 6, p. 1–18, 2016.
- 85 Silva, G.R. da; Pereira, A.H.C.; et al. Internalization of the PDZ and its photodynamic effect on the growth of ATCC and clinical strains of *E. coli* and *S. aureus*. **Laser Physics**, v. 26, n. 9, p. 95603, 2016.
- 86 Robertson, C.A.; Evans, D.H.; et al. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 96, n. 1, p. 1–8, 2009.
- 87 Zijlstra, W.G.; Buursma, A.; et al. Absorption spectra of human fetal and adult oxyhemoglobin, de-oxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin. **Clinical Chemistry**, v. 37, n. 9, p. 1633–1638, 1991.
- 88 Ben-Hur; Margolis-Nunno, H.; et al. Photodynamic decontamination of blood for transfusion. **SPIE 2325, Photodynamic Therapy of Cancer II**, v. 2325, p. 166–173, 1995.
- 89 Gottlieb, P.; Margolis-Nunno, H.; et al. Inactivation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms in blood components with a psoralen and ultraviolet A light. **Photochemistry and photobiology**, v. 63, n. 5, p. 562–5, 1996.
- 90 Lustigman, S.; Ben-Hur, E. Photosensitized inactivation of *Plasmodium falciparum* in human red cells by phthalocyanines. **Transfusion**, v. 36, n. 6, p. 543–546, 1996.
- 91 Hur, E. Ben; Chan, W.S.; et al. Photochemical decontamination of red blood cell concentrates with the silicon phthalocyanine PC 4 and red light. **Developments in Biological Standards**, v. 102, p. 149–155, 1999.
-

-
- 92 Mohr, H.; Bachmann, B.; et al. Virus inactivation of blood products by phenothiazine dyes and light. **Photochemistry and photobiology**, v. 65, n. 3, p. 441–445, 1997.
- 93 Klein, H.G. Pathogen inactivation technology: Cleansing the blood supply. **Journal of Internal Medicine**, v. 257, n. 3, p. 224–237, 2005.
- 94 Wagner, S.J.; Storry, J.R.; et al. Red cell alterations associated with virucidal methylene blue phototreatment. **Transfusion**, v. 33, n. 1, p. 30–36, 1993.
- 95 Wagner, S.J.; Skripchenko, A.; et al. Preservation of red cell properties after virucidal phototreatment with dimethylmethylene blue. **Transfusion**, v. 38, n. 8, p. 729–737, 1998.
- 96 Spesia, M.B.; Rovera, M.; et al. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mitis* by cationic zinc(II) phthalocyanines in media with blood derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 6, p. 2198–205, 2010.
- 97 Wu, X.; Hu, X.; et al. Ultraviolet blood irradiation: is it time to remember “the cure that time forgot”? **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 157, p. 89–96, 2016.
- 98 Buonanno, M.; Randers-Pehrson, G.; et al. 207-nm UV Light - A promising tool for safe low-cost reduction of surgical site infections. I: in vitro studies. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–7, 2013.
- 99 Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; et al. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2000.
- 100 Corrêa, T.Q.; Blanco, K.C.; et al. Manual operated ultraviolet surface decontamination for healthcare environments. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 35, p. 1–6, 2017.
- 101 Ronnqvist, M.; Mikkela, A.; et al. Ultraviolet Light Inactivation of Murine Norovirus and Human Norovirus GII: PCR May Overestimate the Persistence of Noroviruses Even When Combined with Pre-PCR Treatments. **Food and Environmental Virology**, v. 6, n. 1, p. 48–57, 2014.
- 102 Gayán, E.; Condón, S.; et al. Biological aspects in food preservation by ultraviolet light: a review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 1, p. 1–20, 2013.
- 103 Kowalski, W. **Ultraviolet germicidal irradiation handbook: UVGI for air and surface disinfection**. Berlim: Springer, 2009.
- 104 Moore, G.; Ali, S.; et al. Use of UV-C radiation to disinfect non-critical patient care items: a laboratory assessment of the Nanoclave Cabinet. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 174, 2012.
-

-
- 105 Levashenko, G.I. Ultraviolet irradiation of blood. **Biomedical Engineering**, v. 33, n. 3, p. 141–143, 1999.
- 106 Knott, E.K. Development of ultraviolet blood irradiation. **The American Journal of Surgery**, v. 76, n. 2, p. 165–171, 1948.
- 107 Seltsam, A.; Müller, T.H. UVC irradiation for pathogen reduction of platelet concentrates and plasma. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 38, n. 1, p. 43–54, 2011.
- 108 Seghatchian, J.; Tolksdorf, F. Characteristics of the THERAFLEX UV-Platelets pathogen inactivation system - An update. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 46, n. 2, p. 221–229, 2012.
- 109 Caillet-Fauquet, P.; Giambattista, M.D.; et al. Continuous-flow UVC irradiation: A new, effective, protein activity-preserving system for inactivating bacteria and viruses, including erythrovirus B19. **Journal of Virological Methods**, v. 118, n. 2, p. 131–139, 2004.
- 110 Wang, J.; Mauser, A.; et al. Virus inactivation and protein recovery in a novel ultraviolet-C reactor. **Vox Sanguinis**, v. 86, n. 4, p. 230–238, 2004.
- 111 Dai, T.; Vrahas, M.S.; et al. Ultraviolet C irradiation: an alternative antimicrobial approach to localized infections? **Expert review of anti-infective therapy**, v. 10, n. 2, p. 185–95, 2012.
- 112 Alberts, B.; Johnson, A.; et al. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- 113 Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; et al. **Brock biology of microorganisms**. San Francisco, USA: Pearson Education, 2012.
- 114 Engelmann, F.M.; Mayer, I.; et al. Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, n. 2, p. 175–185, 2007.
- 115 Detty, M.R.; Gibson, S.L.; et al. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 16, p. 3897–3915, 2004.
- 116 Yagupsky, P.; Nolte, F.S. Quantitative aspects of septicemia. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 3, p. 269–279, 1990.
- 117 Nowis, D.; Stokłosa, T.; et al. The influence of photodynamic therapy on the immune response. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 4, p. 283–298, 2005.
-

-
- 118 Denis, T.G.S.; Aziz, K.; et al. Combination approaches to potentiate immune response after photodynamic therapy for cancer. **Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 10, n. 5, p. 792–801, 2011.
- 119 Huang, Y.-Y.; Tanaka, M.; et al. Photodynamic therapy induces an immune response against a bacterial pathogen. **Expert review of clinical immunology**, v. 8, n. 5, p. 479–94, 2012.
- 120 Tanaka, M.; Kinoshita, M.; et al. Photodynamic therapy using intra-articular Photofrin for murine MRSA arthritis: Biphasic light dose response for neutrophil-mediated antibacterial effect. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, n. 3, p. 221–229, 2011.
- 121 Mendanha, S.A.; Anjos, J.L. V; et al. Electron paramagnetic resonance study of lipid and protein membrane components of erythrocytes oxidized with hydrogen peroxide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, p. 473–481, 2012.
- 122 Douplik, A.; Stratonnikov, A.A.; et al. Study of photodynamic reactions in human blood. **Journal of biomedical optics**, v. 5, n. 3, p. 338–349, 2000.
- 123 Zavodnik, I.B.; Zavodnik, L.B.; et al. The mechanism of Zn-phthalocyanine photosensitized lysis of human erythrocytes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 67, n. 1, p. 1–10, 2002.
- 124 Butler, T.; Bradley, C.A.; et al. Plasma components protect erythrocytes against experimental haemolysis caused by mechanical trauma and by hypotonicity. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 73, n. 1, p. 27–33, 1992.
- 125 Moor, A.C.E.; Veen, A. Van Der; et al. Photodynamic sterilization of red cells and its effect on contaminating white cells: Viability and mechanism of cell death. **Transfusion**, v. 39, n. 6, p. 599–607, 1999.
- 126 Trannoy, L.L.; Terpstra, F.G.; et al. Differential sensitivities of pathogens in red cell concentrates to Tri-P(4)-photoinactivation. **Vox Sanguinis**, v. 91, n. 2, p. 111–118, 2006.
- 127 Terpstra, F.G.; Van't Wout, A.B.; et al. Potential and limitation of UVC irradiation for the inactivation of pathogens in platelet concentrates. **Transfusion**, v. 48, n. 2, p. 304–313, 2008.
- 128 Mohr, H.; Gravemann, U.; et al. Inactivation of pathogens in single units of therapeutic fresh plasma by irradiation with ultraviolet light. **Transfusion**, v. 49, n. 10, p. 2144–2151, 2009.
-

ANEXO A – Publicações e colaborações

1. Corrêa, T.Q.; Blanco, K.C.; Inada, N.M.; Hortenci, M.F.; Costa, A.A.; Silva, E.S.; Gimenes, P.P.C.; Pompeu, S.; Holanda e Silva, R.L.; Figueiredo, W.M.; Bagnato, V.S. Manual operated ultraviolet surface decontamination for healthcare environments. *Photomedicine and Laser Surgery JCR*, p.1-6, 2017. doi: 10.1089/pho.2017.4298.
 2. Decarli, M.C.; Corrêa, T.Q.; Vollet-Filho, J.D.; Bagnato, V.S.; Souza, C.W.O. The influence of experimental conditions on the final result of photoinhibition of *Staphylococcus aureus*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy JCR*, 2017.
 3. Decarli, M.C.; Carvalho, M.T.; Corrêa, T.Q.; Bagnato, V.S.; Souza, C.W.O. Different photoresponses of microorganisms: from bioinhibition to biostimulation. *Current Microbiology JCR*, v.72, p.473-481, 2016.
 4. Panhóca, V.H.; Florez, F.L.E.; Corrêa, T.Q.; Paolillo, F.R.; Souza, C.W.O.; Bagnato, V.S. Oral decontamination of orthodontic patients using photodynamic therapy mediated by blue-light irradiation and curcumin associated with sodium dodecyl sulfate. *Photomedicine and Laser Surgery JCR*, v.34, p.411-417, 2016.
 5. Corrêa, T.Q.; Inada, N.M.; Kurachi, C.; Bagnato, V.S. Evaluation of the photodynamic therapy as a potential technique for blood decontamination. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy JCR*, v.12, p.352-353, 2015.
 6. Suzuki, I.L.; Inada, N.M.; Marangoni, V.S.; Silva, A.P.; Corrêa, T.Q.; Zucolotto, V.; Kurachi, C.; Bagnato, V.S. New formulations nanostructured containing curcumin for optimization in photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy JCR*, v.12, p.359-359, 2015.
 7. Panhóca, V.H.; Geralde, M.C.; Corrêa, T.Q.; Carvalho, M.T.; Souza, C.W.O.; Bagnato, V.S. Enhancement of the photodynamic therapy effect on *Streptococcus mutans* biofilm. *Journal of Physical Science and Application*, v.4, p.107-114, 2014.
-

ANEXO B – Trabalhos completos publicados em anais de congresso

1. Thaila Quatrini Corrêa; Sebastião Pratavieira; Vanderlei Salvador Bagnato. Analysis of Photogem (hematoporphyrin derivative) and blood interaction. Proc. SPIE 10417, Medical Laser Applications and Laser-Tissue Interactions VIII, p.104170T, 2017. doi:10.1117/12.2282146.
 2. Thaila Quatrini Corrêa; Natalia Mayumi Inada; Sebastião Pratavieira; Kate Cristina Blanco; Cristina Kurachi; Vanderlei Salvador Bagnato. Photodynamic inactivation of contaminated blood with *Staphylococcus aureus*. Proc. SPIE 9694, Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXV, p.969414, 2016. doi:10.1117/12.2213701.
 3. Thaila Quatrini Corrêa; Mariana Carreira Geralde; Mariana Torres Carvalho; Vanderlei Salvador Bagnato; Cristina Kurachi; Clovis Wesley Oliveira de Souza. Photodynamic inactivation of *Acanthamoeba polyphaga* with curcuminoids: an in vitro study. Proc. SPIE 9694, Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXV, p.969415, 2016. doi:10.1117/12.2213130.
 4. Isabella Luiz Suzuki; Natalia Mayumi Inada; Valeria S. Marangoni; Thaila Quatrini Corrêa; Valtencir Zucolotto; Cristina Kurachi; Vanderlei Salvador Bagnato. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles containing mixture of curcuminoids for optimization of photodynamic inactivation. Proc. SPIE 9694, Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXV, p.969413, 2016. doi:10.1117/12.2213781.
-

ANEXO C – Capítulos de livros publicados

1. Corrêa, T.Q.; Inada, N.M.; Kurachi, C.; Bagnato, V.S. Descontaminação sanguínea com terapia fotodinâmica. In: Natalia Mayumi Inada; Kate Cristina Blanco. (Org.). Controle Microbiológico com Ação Fotodinâmica. 1ª edição. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2017, v. 1, p. 107-121.
 2. Corrêa, T.Q.; Inada, N.M.; Bagnato, V.S. Surface UV na descontaminação de superfícies e instrumentos. In: Natalia Mayumi Inada; Kate Cristina Blanco. (Org.). Controle Microbiológico com Ação Fotodinâmica. 1ª edição. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2017, v. 1, p. 273-286.
 3. Pratavieira, S.; Corrêa, T.Q.; Kurachi, C. História da terapia fotodinâmica. In: Vanderlei Salvador Bagnato. (Org.). Terapia Fotodinâmica Dermatológica: Programa TFD Brasil. 1ª edição. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2015, v. 1, p. 23-38.
-

ANEXO D – Participação em eventos

1. Participação e apresentação de pôster, 16th International Photodynamic Association World Congress, Coimbra, Portugal, 2017. Pôster: Evaluation of Photodithazine® in the photodynamic inactivation of blood.
 2. Participação e apresentação de pôster, SPIE Photonics West Congress, São Francisco, Estados Unidos, 2016. Pôster: Photodynamic inactivation of contaminated blood with *Staphylococcus aureus*.
 3. Participação e apresentação de pôster, 15th International Photodynamic Association World Congress, Rio de Janeiro, Brasil, 2015. Pôster: Evaluation of the photodynamic therapy as a potential technique for blood decontamination.
 4. Participação e apresentação de pôster, 67ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC), São Carlos, Brasil, 2015. Pôster: Efeitos da terapia fotodinâmica na descontaminação de sangue.
-