Fundação Educacional do Município de Assis
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis
Campus "José Santilli Sobrinho"

HÉLITA CICILIATO DE PAULA FERNANDES

INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DA *ESCHERICHIA COLI* UTILIZANDO AZUL DE METILENO

Assis
2010

Av. Getúlio Vargas, 1200 – Vila Nova Santana – Assis – SP – 19807-634
Fone/Fax: (0XX18) 3302 1055 homepage: www.fema.edu.br

HÉLITA CICILIATO DE PAULA FERNANDES

INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DA *ESCHERICHIA COLI* UTILIZANDO AZUL DE METILENO

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisito do Curso de Graduação

Orientador: Prof^{o} Dr. Idélcio Nogueira da Silva

Área de Concentração: Química

Assis
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

FERNANDES, Hélita Ciciliato de Paula

Inativação Fotodinâmica de Escherichia coli utilizando Azul de Metileno / Hélita Ciciliato de Paula Fernandes. Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA -- Assis, 2010.

47p.

Orientador: Idécio Nogueira da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA.

1.Inativação Fotodinâmica. 2.Azul de Metileno.

CDD:660

Biblioteca da FEMA

INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE *ESCHERICHIA COLI* UTILIZANDO AZUL DE METILENO

HÉLITA CICILIATO DE PAULA FERNANDES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisito do Curso de Graduação, analisado pela seguinte comissão examinadora:

Orientador: Prof^{o} Dr. Idélcio Nogueira da Silva

Analisador: Prof^{a} Dr^{a}. Silvia Maria Batista de Souza

Assis
2010

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a DEUS pela sabedoria proporcionada durantes estes quatro anos.

Aos meus amados pais, Osni e Aparecida, e aos meus irmãos, Helton e Hellen, pelo carinho, amor e perseverança que me fizeram ter forças e ânimo durante os momentos difíceis, mas principalmente pelos momentos felizes que jamais serão esquecidos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS pela oportunidade de finalizar mais uma etapa em minha vida.

Aos meus amados pais, Osni de Paula Fernandes e Aparecida Ciciliato Fernandes, pelo amor, carinho e apoio que foram como combustível e sustento durante toda a minha jornada.

Ao meu amado irmão Helton Ciciliato de Paula Fernandes pelo apoio concedido quando mais precisei, a minha irmã Hellen Ciciliato de Paula Fernandes por sempre me ajudar nas horas de aflição e aos dois por fazerem parte da minha vida.

A minha cunhada Daniela Cristina de Camargo Ribeiro pelas orientações em momentos de dúvidas e de nervosismo durante toda a execução do trabalho.

Aos meus amigos do lado direito, Rando, Guilherme, Angela, Cleiton e Raphael que aos meus pedidos de socorro sempre estiveram as prontas para me ajudar.

Aos meus colegas de sala de aula, Adriana, Alessandra, Alexandre Mazalli, Alexandre Pirolo, Carlos, Gracieli, Helton, Jarley, Lucas, Pamela, Raphael Souza, Ricardo, Rodolfo, Tatiana, Tiago e Renan que fizeram parte desses quatro anos de muitos sorrisos estampados nos rostos, mas também de muitas caras feias quando fazíamos provas, que serão eternamente lembrados e jamais esquecidos.

Ao meu namorado Fernando Ferreira da Costa pelo apoio e compreensão nos mais difíceis momentos de stress, angústia e mau humor das noites mal dormidas durante todo o ano.

Aos professores que contribuíram para a minha formação e que também fizeram parte de momentos de distrações que jamais serão esquecidos, mas especialmente ao meu orientador Idélcio que durante todo o ano me aconselhou e ensinou o grande segredo da vida, a Química.

Bem aventurado aquele que teme ao Senhor e anda nos seus caminhos. Pois comerás do trabalho de tuas mãos; feliz serás, e te irá bem.

Salmos 128: 1-2

RESUMO

Apesar do considerável progresso que tem sido obtido nos tratamentos de infecções, o crescente número de bactérias resistentes a antibióticos no mundo tem aumentado. A resistência da *E. coli* à antibióticos está levando a ciência a desenvolver novos procedimentos de intervenção no sentido de promover inviabilização do crescimento microbiano. A Inativação Fotodinâmica ("PDI, Photodynamic Inactivation") baseia-se na administração tópica ou sistêmica de um corante sensível à luz, seguida da irradiação em baixas doses com luz visível de comprimento de onda adequado. É um tratamento utilizado para a morte celular de microorganismos como bactérias, fungos, leveduras e vírus. Por ser um tratamento que utiliza medicamentos e equipamentos de elevado custo, a busca por fotossensibilizadores de baixo custo e fácil acesso, bem como fontes de luz alternativas tem sido aumentada. O Azul de metileno é um fotossensibilizador que por irradiação com um comprimento de luz adequado, como LED's de luz vermelha, podem levar à morte celular de bactérias como a *Escherichia coli*. O presente trabalho teve por objetivo medir a eficiência do azul de metileno como fotossensibilizador na eliminação da bactéria *Escherichia coli.* Além de ser de fácil acesso e por ser barato, o azul de Metileno produz espécies reativas de oxigênio, tal como o oxigênio singlete, gerando reações fotoquímicas que levam à morte celular. No presente experimento realizado o azul de metileno foi utilizado em diferentes concentrações sobre a bactéria *E. coli*, onde teve um poder de inibição tanto no experimento realizado no escuro, quanto no experimento realizado com irradiação por LED's. A irradiação se mostrou ligeiramente mais eficiente na morte de bactérias. Essa diferença é devido a geração do oxigênio singlete.

Palavras-chave: Inativação Fotodinâmica, *Escherichia coli*, Azul de Metileno.

ABSTRACT

Despite the considerable progress that has been obtained in the treatment of infections, the increasing number of bacteria resistant to antibiotics has increased worldwide. The resistance of E. coli to antibiotics is leading the science to develop new intervention procedures to promote non-viability of microbial growth. Photodynamic inactivation (PDI, Photodynamic inactivation ") is based on systemic or topical administration of a dye sensitive to light, followed by low dose irradiation with visible light of appropriate wavelength. It is a treatment used for cell death of microorganisms such as bacteria, fungi, yeasts and viruses. Because it is a treatment that uses drugs and equipment with high cost, the search for photosensitizers low cost and easy access as well as alternative sources of light has been increased. The Methylene blue is a photosensitizer that by irradiation with an appropriate wavelength of light as red light LEDs, can lead to cell death of bacteria such as Escherichia coli. This study aimed to measure the efficiency of methylene blue as photosensitizer in the elimination of the bacterium Escherichia coli. Besides being easily accessible and for being cheap, the methylene blue produces reactive oxygen species such as singlet oxygen, generating photochemical reactions that lead to cell death. In this experiment the methylene blue was used in different concentrations of the bacterium E. coli, where he had a power of inhibition in both the experiment conducted in the dark, as in the experiment with irradiation by LEDs. Irradiation was shown to be slightly more efficient in killing of bacteria. This difference is due to singlet oxygen generation.

Keywords: Photodynamic inactivation, *Escherichia coli*, Methylene Blue.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diagrama de Jablonski 18
Figura 2 - Geração do ânion-radical superóxido e radical hidroxila 19
Figura 3 - Formação do oxigênio singlete 19
Figura 4 - Oxigênio molecular em seu estado triplete 20
Figura 5 - Elétrons com o mesmo número quântico no mesmo orbital 21
Figura 6 - Anel porfirínico 22
Figura 7 - Fármacos derivados de HpD: Photofrin®(A), Photogem®(B) 23
Figura 8 - Photoditazine® 24
Figura 9 - Corantes xantenos: Rosa de Bengala (A), Eosina Y (B) 25
Figura 10 - Corantes fenotiazínicos: Azul de Toluidina (A), Azul de Metileno (B) 25
Figura 11 - Azul de Metileno 26
Figura 12 - Superposição do Azul de Metileno sobre par guanina-citosina (G-C) 27
Figura 13 - Estrutura de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas 30
Figura 14 - Escherichia coli 31
Figura 15 - Amostras em crescente concentração de Azul de metileno 38
Figura 16 - Curva de inibição de crescimento em diversas concentrações de AM sem luz 39
Figura 17 - Curva de inibição de crescimento em diversas concentrações de AM sem luz 39
Figura 18 - Curva de inibição de crescimento em diversas concentrações de AM após a irradiação 40
Figura 19 - Curva de inibição de crescimento em diversas concentrações de AM após a irradiação 40
Figura 20 - Posicionamento dos LED's sobre as amostras 42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TFD	Terapia Fotodinâmica
FS	Fotossensibilizador
PDI	Photodynamic Inactivation
RB	Rosa de Bengala
AM	Azul de Metileno
Hp	Hematoporfirina
HpD	Derivado de Hematoporfirina
PZ	Photodithazine®
DNA	Ácido nucléico
EEC	Enteropatogênicos
CMH	Caldo Muller Hinton
LED’s	Diodo Emissor de Luz

LISTA DE SÍMBOLOS

^{0}F	Fotossensível
^{1}F	Fotossensível singlete
^{3}F	Fotossensível excitado
$(\bullet O_2^-)$	Ânion- radical superóxido
(•OH)	Radical hidroxila
$S^{-\bullet}$	Substrato carregado
S	Substrato
$^{3}O_2$	Oxigênio triplete
$^{1}O_2$	Oxigênio singlete
O_2	Oxigênio
%T	Transmitância

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14

2. TERAPIA FOTODINAMICA 15

2.1 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA 16

2.2 HISTÓRICO 16

2.3 MECANISMOS DE FOTOSSENSIBILIZAÇÃO 17

2.4 OXIGÊNIO SINGLETE 19

3. CORANTES 22

3.1 AZUL DE METILENO 26

4. BACTÉRIAS 29

4.1 ESCHERICHIA COLI 31

5. CROMATOGRAFIA DE PAPEL APLICADA AO ENSINO MÉDIO 33

5.1 PARTE EXPERIMENTAL 34

6. METOLODOGIA 36

6.1 MATERIAIS E SOLUÇÕES 36

6.2 EQUIPAMENTOS 36

6.3 PROCEDIMENTO 37

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO 38

8. CONCLUSÃO 43

REFERÊNCIAS 44

1. INTRODUÇÃO

Apesar do considerável progresso que tem sido obtido nos tratamentos de infecções, o crescente número de bactérias resistentes a antibióticos no mundo todo tem aumentado (PERUSSI, 2007).

A *Escherichia coli* além de ser uma bactéria de fácil obtenção e manuseio é a mais comum e uma das mais antigas bactérias simbiontes do homem. Porém em excesso no trato intestinal de humanos pode levar à sérios problemas de saúde (ALVES; MAGALHÃES; OLIVEIRA, 2010; SANTOS; OLIVEIRA; MENEZES, 2009).

A resistência da *E. coli* à antibióticos está levando a ciência a desenvolver novos procedimentos de intervenção no sentido de promover inviabilização do crescimento microbiano (SANTOS; OLIVEIRA; MENEZES, 2009).

A Inativação Fotodinâmica tem-se tornando uma área de pesquisa em expansão que envolve a combinação sinergética de um fotossensibilizador, oxigênio molecular e luz de comprimento de onda adequado, que tem por objetivo inviabilizar moléculas presentes ao redor e levar à morte celular do tecido doente (SANTOS; OLIVEIRA; MENEZES, 2009).

Por ser um tratamento que utiliza medicamentos e equipamentos de elevado custo, a busca por fotossensibilizadores de baixo custo e fácil acesso, bem como fontes de luz alternativas tem sido aumentada (SOARES, 2006).

Azul de metileno, azul de toluidina e rosa de bengala são alguns dos fotossensibilizadores que por irradiação com um comprimento de luz adequado, como LEDs de luz vermelha, podem levar à morte celular de bactérias como a *Escherichia coli* (PERUSSI, 2007).

Sua acessibilidade e eficiência fazem com que a Inativação fotodinâmica tenha efeito bactericida rápido e assim as bactérias não tenham resistência, por esse motivo o presente trabalho objetivou medir a eficiência do azul de metileno como fotossensibilizador na eliminação da bactéria *Escherichia coli.*

2. TERAPIA FOTODINÂMICA

A Terapia Fotodinâmica (TFD) baseia-se na administração tópica ou sistêmica de um corante sensível à luz, seguida da irradiação em baixas doses com luz visível de comprimento de onda adequado (PERUSSI, 2007).

O tratamento se inicia na administração ao paciente do fotossensibilizador (FS) por via sanguínea, e dependendo do tipo de corante, é absorvido por células de todo o corpo. O FS permanece nas células tumorais por um período de tempo maior que nas células normais (PERUSSI, 2007; BUCK, 2009).

A ativação com luz é realizada apenas quando praticamente todo FS deixou suas células normais, mas ainda está presente nas células cancerosas, levando então à reação fotodinâmica (PERUSSI, 2007).

Na presença de oxigênio encontrado nas células, o fotossensibilizador (FS) ativado pode reagir com moléculas na sua vizinhança por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de radicais livres ou por transferência de energia ao oxigênio, levando a produção de oxigênio singlete. Ambos os caminhos levam a interação entre o estado excitado do corante e o oxigênio, que tendem a penetrar nas vizinhanças do tecido afetado, iniciando uma cadeia de reações bioquímicas, resultando em danos de diferentes proporções no tecido doente, levando a morte celular (PERUSSI, 2007; MACHADO, 2000).

A TFD é normalmente utilizada no tratamento de vários tipos de câncer como de bexiga, pulmão, esôfago, gástrico e cervical, além de degeneração macular da retina, artrite, restenose tanto em veias como artérias, micoses fungóides, infestações bacterianas, verrugas, arteriosclerose entre muitas outras doenças (PERUSSI, 2007; FERNANDES, 2007).

2.1 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA

Com os mesmos princípios utilizados na TFD, a Inativação Fotodinâmica (“PDI, Photodynamic Inactivation”) é um tratamento utilizado para a morte celular de microorganismos como bactérias, fungos, leveduras e vírus (PERUSSI, 2007).

Sua aplicabilidade antimicrobiana tem se dado ao fato de as bactérias se tornarem resistentes aos antibióticos, tornando-se uma área em expansão na procura de novos tratamentos que levem a morte celular (SANTOS; OLIVEIRA; MENEZES, 2009).

Para que a PDI tenha eficiência, a escolha do FS deve ser feita através do alvo celular. O FS age via oxigênio singlete sendo absorvido pela célula doente, e capturado pelos micróbios, levando a uma reação fotodinâmica. Não existindo resistência microbiana natural, o FS levará a morte celular do tecido doente (PERUSSI, 2007).

Diferente da TFD, a PDI utiliza FS pertencentes a diferentes grupos de compostos tais como os xantenos halogenados como Rosa de Bengala (RB), fenotiazínicos como o Azul de Toluidina e o Azul de Metileno (AM), e acridinas e conjugados de clorina (GONZALES, 2007).

2.2 HISTÓRICO

O uso de luz e corantes teve por início no antigo Egito, com o objetivo de tratar doenças, há mais de 4.000 anos. Os egípcios deram início à terapia ingerindo plantas (contendo psoralenos) e se expondo à luz solar, para tratar doenças como o vitiligo (PAOLI, 2005; SIMPLICIO, 2002).

Entretanto, o estudo das reações de fotossensibilização induzidas por fármacos teve início com Oscar Raab no final do século XIX. Raab investigou o efeito dos corantes eosina e acridina sobre o paramécio, que foi imediatamente erradicado em presença de luz (FERNANDES, 2007).

Em 1901, Finsen acreditava que a radiação solar poderia ser utilizada na cura de *Lupus vulgaris* (SIMPLICIO, 2002).

Em 1903, Tappeiner e Jesionek observaram a redução de um tumor quando o colocaram em contato com uma solução de eosina e luz branca. Estes corantes formados receberam o nome de “fármacos fotossensíveis” e o fenômeno observado como “ação fotodinâmica” (PAOLI, 2005; FERNANDES, 2007).

Meyer-Betz, em 1912, estudou o efeito fotodinâmico de porfirinas em humanos, injetando em si mesmo 200 mg de hematoporfirina (Hp). Após expor pequenas regiões da pele de seu braço a luz solar queimava seu braço, indicando que a Hp possui um efeito fototóxico (PAOLI, 2005).

Em 1925, Policard estudou as porfirinas observando a produção de efeitos fototóxicos em tecidos, principalmente em tumores malignos (SIMPLICIO, 2002).

Os primeiros derivados hematoporfirínicos para a TFD começam com Schwartz no início da década de 50 (SIMPLICIO, 2002).

Schwartz descobriu que o efeito colateral observado por Meyer-Betz não era devido à hematoporfirina, mas devido a uma mistura de derivados diméricos e oligoméricos da hematoporfirina. Schwartz enriqueceu a mistura de oligômeros (chamou o preparado de (HpD) (PAOLI, 2005; FERNANDES, 2007).

Lipson sob orientação de Schwartz na década de 60, investigou o acúmulo preferencial de derivados hematoporfirínicos em tumores implantados em camundongos e ratos e observou que a irradiação de luz proporcionava a regressão da doença (SIMPLICIO, 2002; FERNANDES, 2007).

No final da década de 60, Lipson obteve sucesso com a irradiação de um câncer de mama usando HpD, marcando assim o início da TFD (SIMPLICIO, 2002).

2.3 MECANISMOS DE FOTOSSENSIBILIZAÇÃO

O diagrama de Jablonski na figura 1 representa os processos fotofísicos que um fotossensibilizador pode sofrer após a iluminação.

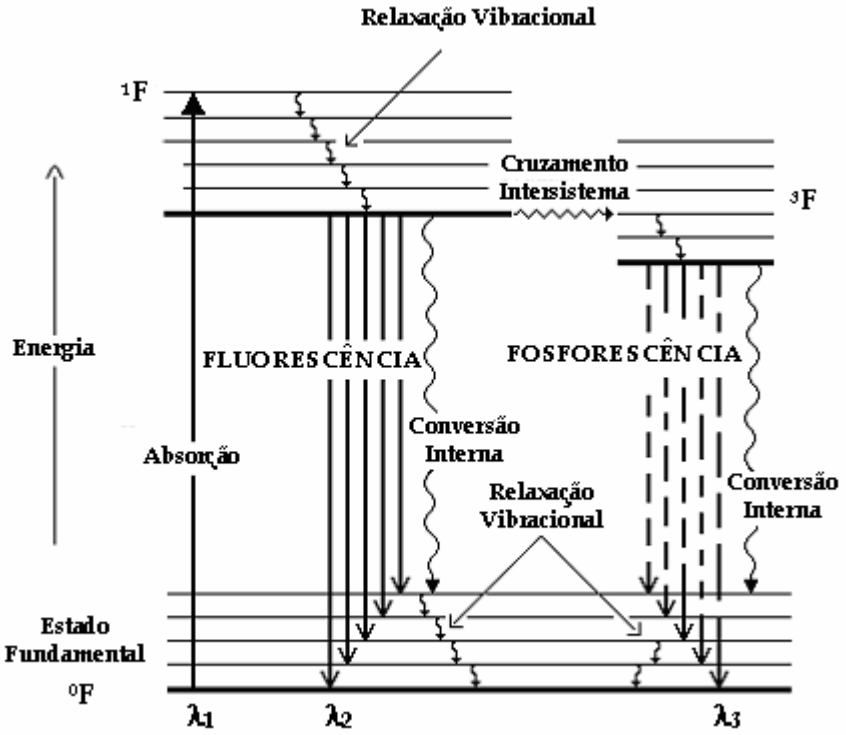

Figura 1. Diagrama de Jablonski. (In: PAOLI, 2005, p. 41)

O fotossensibilizador (^{0}F) é excitado para o estado singlete superior (^{1}F). ^{1}F pode interagir com moléculas vizinhas perdendo energia rapidamente, através de processos radiativos (fluorescência) e/ou não radiativos (conversão interna, cruzamento intersistemas). Para a TFD o mais importante dos processos é o cruzamento intersistemas, que caracteriza uma inversão de spin eletrônico, que leva o FS ao seu estado triplete excitado (^{3}F), é a partir desse estado excitado que o FS reage com as moléculas vizinhas, acontecendo as reações fotodinâmicas (PAOLI, 2005).

O FS reage com as moléculas por transferência de elétrons ou abstração de hidrogênio, que levam a formação de radicais livres ou transferência de energia ao oxigênio (PERUSSI, 2007).

Reação I: a transferência de elétron entre o FS no estado triplete excitado (^{3}F) para as moléculas de substratos orgânicos, gerando ânion-radical superóxido ($\bullet O_2^-$) e radical hidroxila (•OH) (PERUSSI, 2007; ALBUQUERQUE, 2008).

A reação da figura 2 ilustra a geração do ânion-radical superóxido e radical hidroxila

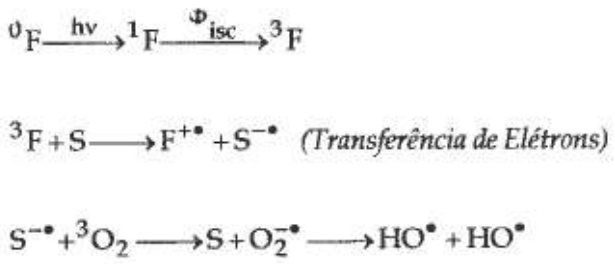

Figura 2. Geração do ânion-radical superóxido e radical hidroxila. (In: PAOLI, 2005, p. 43)

Reação II: O FS em seu estado excitado triplete (^3F) transfere sua energia diretamente para o O_2 formando o oxigênio singlete ($^1O_2$) (PERUSSI, 2007; ALBUQUERQUE, 2008).

A reação da Figura 3 ilustra a formação do oxigênio singlete.

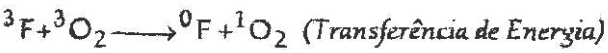

Figura 3. Formação do oxigênio singlete. (In: PAOLI, 2005, p. 43)

2.4 OXIGÊNIO SINGLETE

O oxigênio molecular possui uma configuração eletrônica para o estado fundamental, a presença de dois elétrons desemparelhados no orbital 2π* sendo um deles localizado no orbital 2πx* e outro no 2πy*, em acordo com a regra de Hund (PAOLI, 2005).

A existência de dois elétrons desemparelhados na molécula confere paramagnetismo ao oxigênio molecular. Devido a presença do campo magnético, formam-se três diferentes momentos angulares de spin, ambos orientados para

cima, ambos orientados para baixo, e um para cima e outro para baixo, podendo assim ser descrito como oxigênio triplete (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A Figura 4 representa o oxigênio molecular em seu estado triplete.

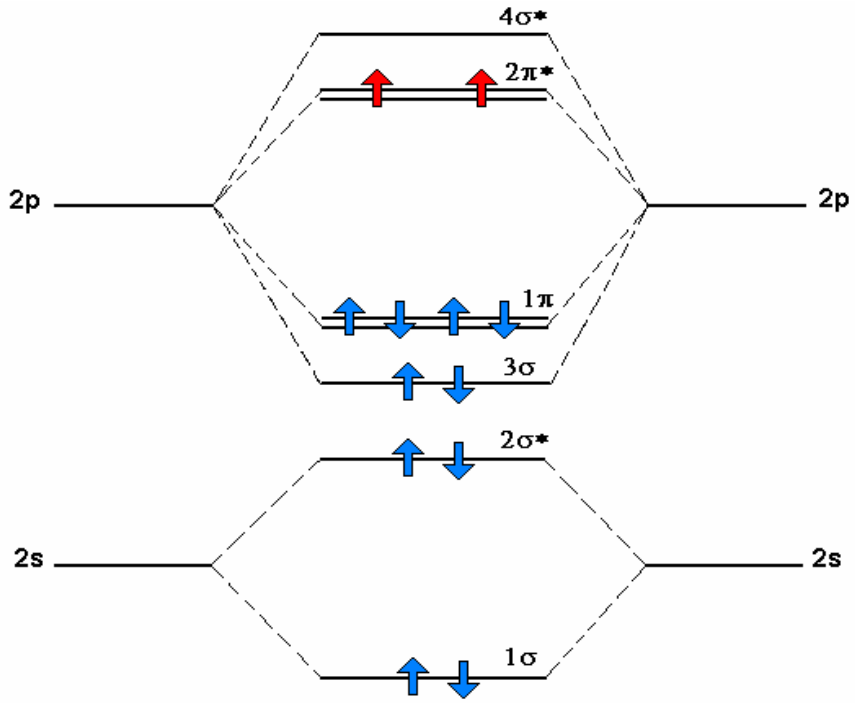

Figura 4. Oxigênio molecular em seu estado triplete. (In: PAOLI, 2005, p. 44)

Portanto confere uma barreira para a reação com a maioria das moléculas orgânicas e a estrutura eletrônica do oxigênio em seu estado fundamental, isso ocorre porque os elétrons com spins opostos de tais moléculas orgânicas devem juntar-se aos elétrons desemparelhados do O_2, possuindo o mesmo número quântico de spin em um mesmo orbital, tornando-se desfavorável energeticamente descrito pelo princípio de exclusão de Pauli (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A Figura 5 representa os elétrons com o mesmo número quântico num mesmo orbital (PAOLI, 2005).

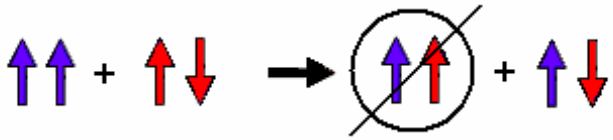

Figura 5. Elétrons com o mesmo número quântico no mesmo orbital. (In: PAOLI, 2005, p. 45)

Para que seja removida essa restrição é preciso que haja a formação do oxigênio singlete, ocorrendo a inversão do spin, que pode ser feita através da transferência de energia de um FS no estado excitado triplete para o oxigênio molecular (PAOLI, 2005).

3. CORANTES

Corantes tem a habilidade de absorver luz visível com eficiência e são capazes de induzir ou participar de reações químicas, podendo ser denominados fotossensibilizadores (MARINHO, 2006).

Os primeiros fotossensibilizadores estudados foram os derivados da Hematoporfirina (HpD), presente no sangue, mais precisamente no sítio ativo da hemoglobina (SILVA, 2007).

A porfirina é estruturalmente constituída por um grupo cromóforo tetrapirrólico, chamado de anel porfirínico, que apresenta um sistema eletrônico altamente conjugado, conferindo a estas moléculas, transições eletrônicas na faixa do visível e ultravioleta (SILVA, 2007).

A Figura 6 representa o anel porfirínico constituído por um grupo cromóforo tetrapirrólico.

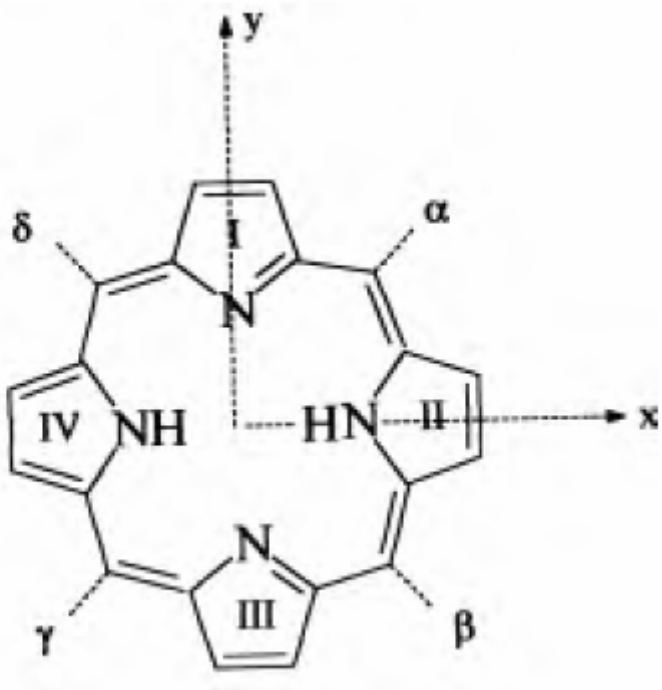

Figura 6. Anel porfirínico (In: SILVA, 2007, p. 6)

As porfirinas e seus derivados constituem uma classe de moléculas que desempenha a transferência de elétrons na cadeia respiratória e transporte e armazenamento de oxigênio (SILVA, 2007).

Os derivados de HpD são denominados FS de primeira geração que levaram ao desenvolvimento dos fármacos na década de 70. Os principais fármacos desenvolvidos são: Photofrin® (de origem americana) e seus análogos Photogem® (de origem russa) e Photosan® (de origem alemã) (MENEZES, 2006).

A figura 7 representa os principais fármacos derivados de HpD, Photofrin® e Photogem®.

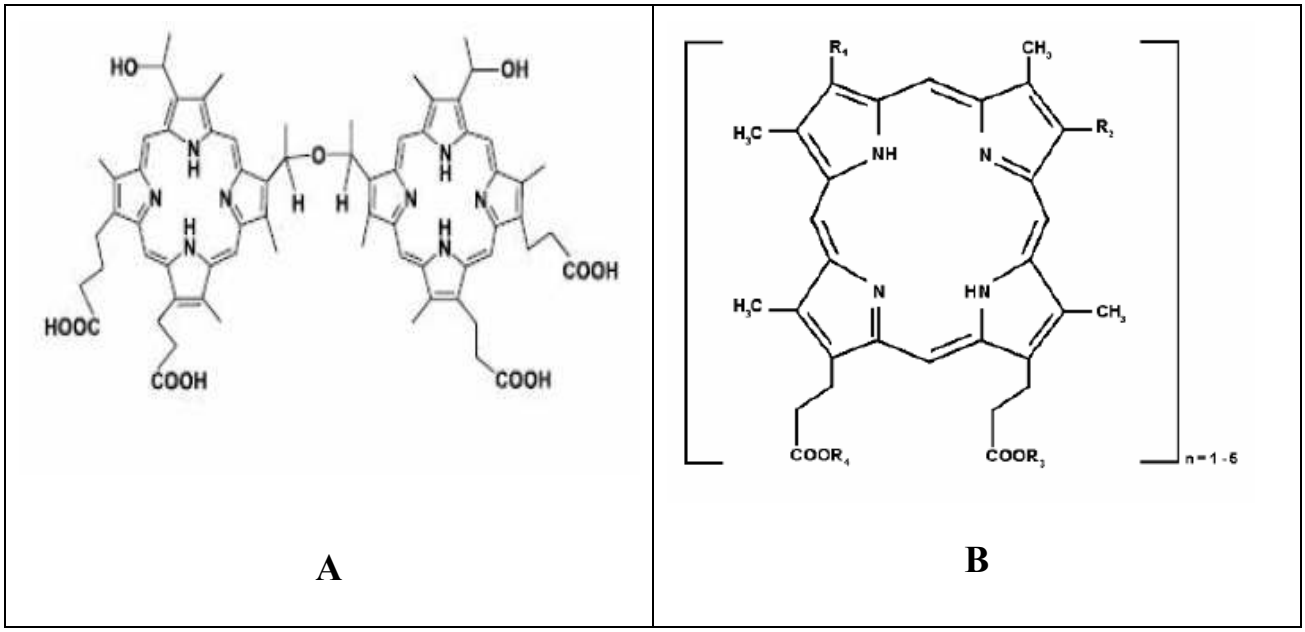

Figura 7. Fármacos derivados de HpD: Photofrin®(A), Photogem®(B) (In: MENEZES, 2006, p. 22 e 27)

Apesar de terem tido grande sucesso na terapia, estes fármacos não possuem constituição química definida e nem foto-estabilidade, além de possuírem algumas desvantagens como acumularem nas células epiteliais e assim o paciente deve permanecer afastado do sol por mais ou menos de 4 a 6 semanas. Outra desvantagem é que sua absorção é baixa no comprimento de onda na região de (600 – 850nm) (SILVA, 2007).

A segunda geração de FS são substâncias com composição química definida, e absorvem luz num comprimento de onda maior, as clorinas. São porfirinas reduzidas que absorvem luz no comprimento de onda de 650-680nm (vermelho) e possui um alto rendimento de formação de oxigênio singlete. O principal fármaco conhecido é o Photodithazine® (PZ) (MENEZES, 2006).

A figura 8 representa o principal fármaco reduzido derivado das clorinas.

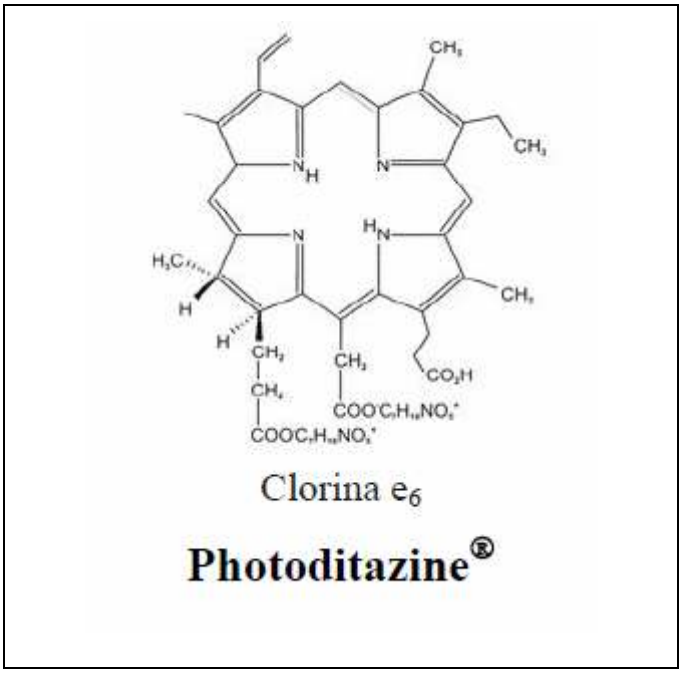

Figura 8. Photoditazine® (In: MENEZES, 2006, p. 27)

Já na PDI os principais FS utilizados são os xantenos, fenotiazínicos, acridinas e conjugados de clorina (PERUSSI, 2007).

Os corantes Xantenos são compostos cíclicos que possuem três anéis aromáticos interligados por um átomo de oxigênio que absorvem na região do visível. Os principais xantenos conhecidos são o Rosa de Bengala, Eosina Y, Fluoresceína e Eritrosina B (PERUSSI, 2007).

A Figura 9 representa os xantenos Rosa de Bengala e a Eosina Y, respectivamente.

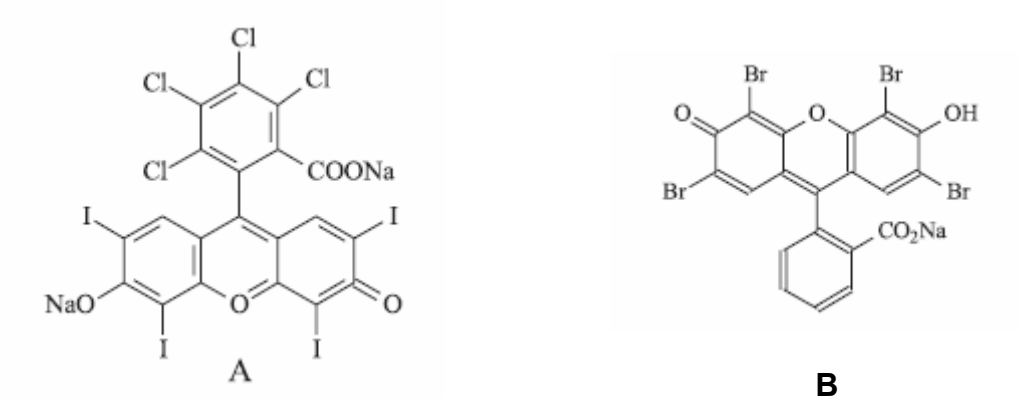

Figura 9. Corantes xantenos: Rosa de Bengala (A), Eosina Y (B) (In: PERUSSI, 2007, p. 989)

Os fenotiazínicos são corantes que absorvem luz no comprimento de onde 600-660nm. Na PDI esses fostossensibilizadores são de grande importância por absorverem luz na região requerida para a penetração no tecido doente. Os principais fenotiazínicos conhecidos são o azul de metileno e azul de toluidina (PERUSSI, 2007).

A Figura 10 representa os fenotiazínicos Azul de Toluidina e Azul de Metileno, respectivamente.

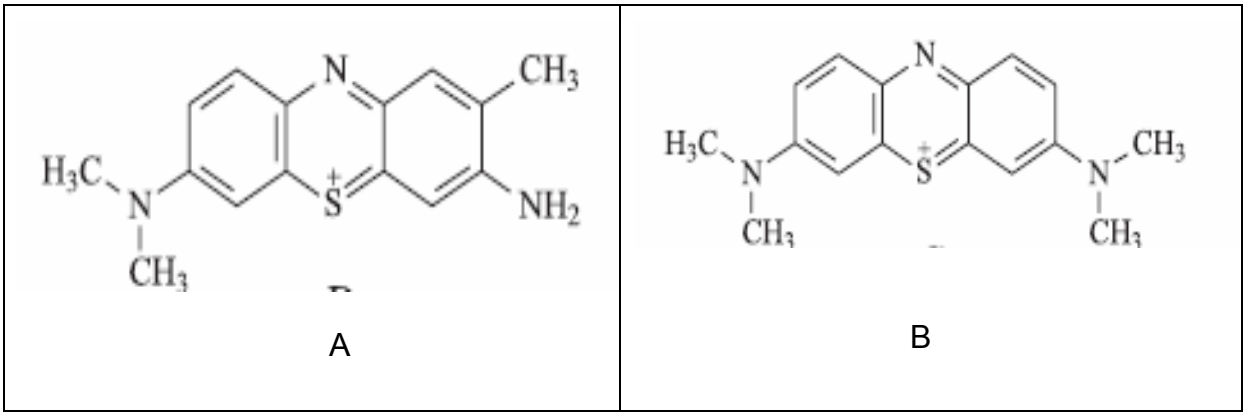

Figura 10. Corantes fenotiazínicos: Azul de Toluidina (A), Azul de Metileno (B) (In: PERUSSI, 2007, p. 989)

Os novos FS devem ter por finalidade:

- Baixa toxicidade, o FS deve apenas apresentar toxicidade sobre o tecido doente quando erradicado por uma luz;
- Rendimento quântico, ou seja, geração do oxigênio singlete;
- Absortividade nas mais altas regiões de comprimento de onda;
- Rápida eliminação do tumor;
- Estável;
- Fácil localização do tumor;
- Não causar mutagenicidade ou carcinogenicidade (SETÚBAL, 2007).

3.1 AZUL DE METILENO

O azul de metileno representado na figura 11, é um composto aromático e heterocíclico, no estado sólido sua coloração é verde escuro, e quando solúvel em água produz coloração azul, é inodoro, e possui fórmula molecular: $C_{16}H_{18}ClN_3S$ (WIKIPEDIA, 2010).

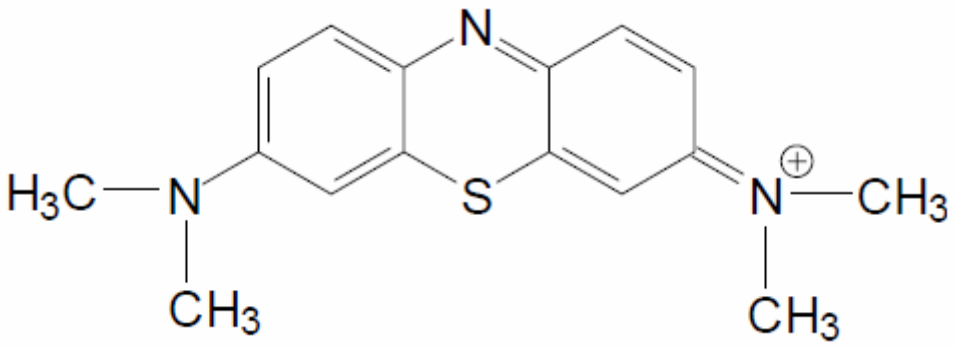

Figura 11. Azul de Metileno (In: PELOI, 2007, p. 7)

O azul de metileno é um corante conhecido há muitos anos, em 1876 devido a expansão industrial o AM era ultilizado como tintura para tecidos (PELOI, 2007).

Em 1891, Ehrlich utilizou o AM no tratamento de malária. A partir de então tem sido utilizado clinicamente no tratamento de organismos vivos (PELOI, 2007).

O AM tem por sua estrutura intercalar na estrutura do ácido nucléico (DNA) devido a carga positiva e a geometria planar do fotossensibilizador, em regiões ricas em guanina e citosina, aculumando-se na mitocondria da célula (PELOI, 2007; GABRIELLI, 2007).

A combinação desse corante na mitocôndria é devido a lipofílicidade e pela carga, que por ser positiva é atraída pela carga negativa da matriz mitocondrial (GABRIELLI, 2007).

A Figura 12 representa a superposição do Azul de Metileno sobre o par guanina-citosina.

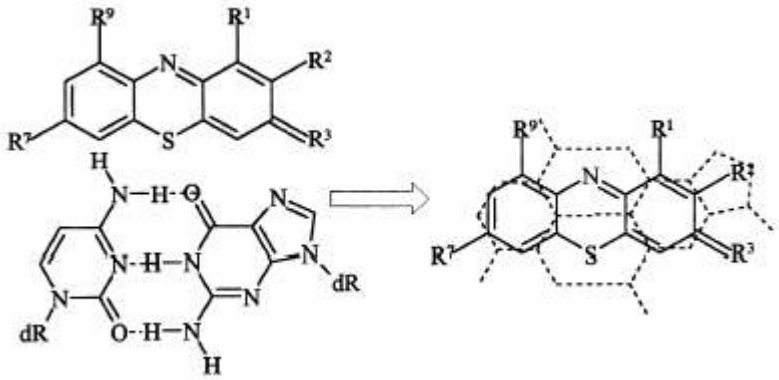

Figura 12. Superposição do Azul de Metileno sobre o par guanina-citosina (G-C) (In: PELOI, 2007, p. 8)

O AM em soluções concentradas apresentam bandas de absorção entre 600-660nm, na região do espectro vermelho, o que é favorável a TFD pela eficiência da penetração de luz (GONZALES, 2007).

Além de ser de fácil acesso e por ser barato, o AM produz espécies reativas de oxigênio, tais como o ânion superóxido e oxigênio singlete (PELOI, 2007; GABRIELLI, 2007).

Devido ao fato do AM ativar o oxigênio singlete, pode gerar reações fotoquímicas levando a morte dos microorganismos tais como bactérias, virus e fungos (PELOI, 2007).

A formação dos produtos dessas reações, é inicialmente a desmetilação no grupo amino conduzindo a formação do Azure e depois a Tionina e por fim ocorre a quebra da molécula se decompondo em espécies benzênicas (PELOI, 2007).

4. BACTÉRIAS

É crescente número de microorganismos resistentes a antibióticos. Isso se deve ao fato de estes microorganismos estão se adaptando aos antibióticos administrados (PERUSSI, 2007; PELOI, 2007).

Devido a esse fato, a PDI tem sido apontada como uma fonte alternativa para a eliminação desses microorganismos (PELOI, 2007).

Em relação à inativação de bactérias, diversos trabalhos tem estabelecido que bactérias Gram-positivas (+) são mais sensíveis a TFD do que as Gram-negativas (-) que são mais resistentes (PAOLI, 2005; PELOI, 2007).

Enquanto que as bactérias Gram-positivas apresentam uma parede celular externa seguida de uma membrana celular, as bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa anterior à parede celular seguida da membrana celular. A figura 13 mostra as diferenças nas estruturas dessas bactérias. A presença da membrana externa confere maior resistência a penetração do FS pela bactéria Gram-negativa (PAOLI, 2005; PELOI, 2007).

A Figura 13 representa as bactérias Gram-positivas e as bactérias Gram-negativas.

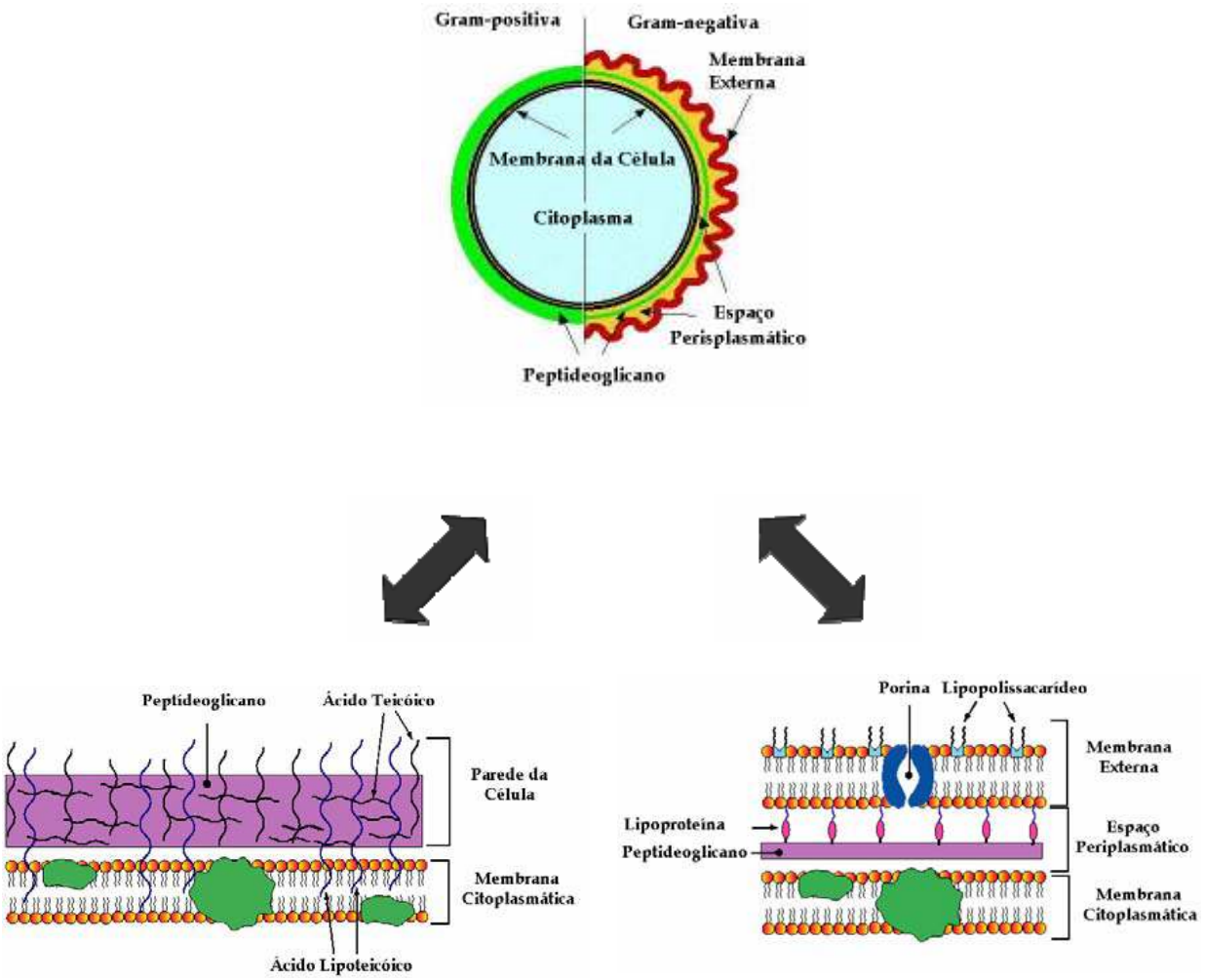

Figura 13. Estrutura de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. (In: PAOLI, 2005, p. 39)

Os antibióticos que são eficientes contra bactérias Gram (+) não são eficientes contra as Gram (-) (PELOI, 2007).

Para que um FS destruir uma bactéria, a membrana citoplasmática deve ser danificada, assim os FS que estão no interior das células são geralmente mais eficientes (PAOLI, 2005).

O dano a membrana externa da célula permite que o FS incorpore em sítios celulares internos onde a ação fotodinâmica acontecerá (PAOLI, 2005).

Bactérias Gram (-) devem ser erradicadas por FS catiônicos. A carga positiva do FS favorece a forte interação eletrostática com os sítios negativamente carregados da superfície bacteriana, aumentando a eficiência do processo fotodinâmico (PAOLI, 2005).

4.1 *ESCHERICHIA COLI*

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, pertencente a família das Enterobacteriaceae possui a forma de um bacilo (WIKIPEDIA, 2010).

A Figura 14 representa a estrutura da Escherichia coli em forma de bacilo vista em um microscópio óptico.

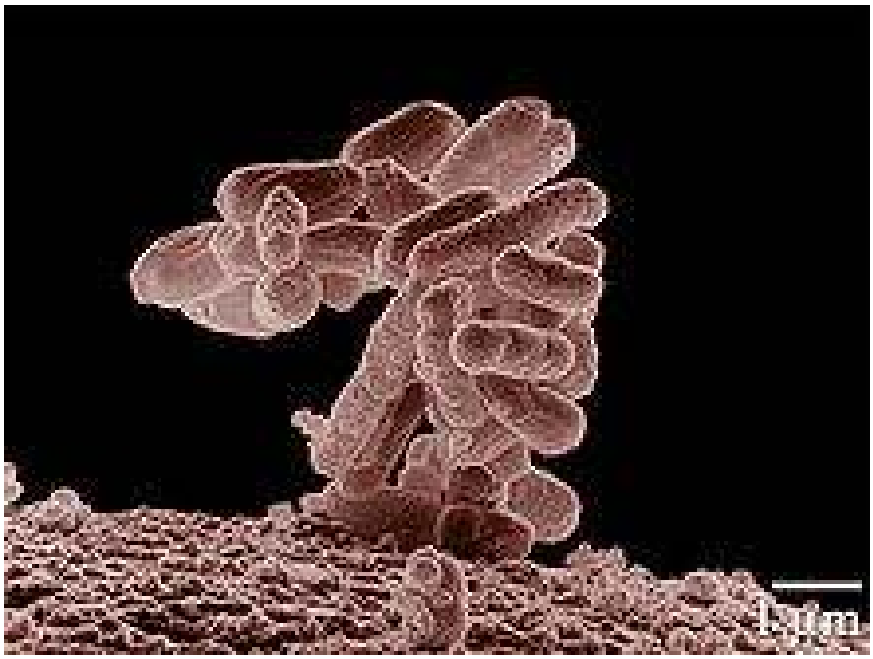

Figura 14. Escherichia coli. (In: WIKIPEDIA, 2010)

A *E.coli* tem como seu habitat natural o lúmen intestinal dos seres humanos e de animais. Possui fímbrias ou adesinas que permitem a sua fixação, impedindo a sua eliminação pela urina ou diarréia. É responsável por metabolizar uma considerável quantidade de vitaminas e exerce o importante papel de impedir a multiplicação de outras bactérias prejudiciais à saúde (PELOI, 2007; WIKIPEDIA, 2010).

Entretanto a *E. coli* compreende um grande grupo de microorganismos que subdividem em mais de 160 sorotipos diferentes, entre eles encontra-se a *E. coli* enteropatogênicos (EEC) que são capazes de provocar infecções intestinais, podendo se tornar casos graves (PELOI, 2007).

A *E.coli* também pode ocasionar doenças no trato intestinal, pode haver sua disseminação nos outros orgãos. Mas isso acontece devido à invasão de estirpes diferentes daquelas normais do indivíduo, que é ocasionada devido à presença de *E. coli* em água ou alimentos infectados por fezes humanas (WIKIPEDIA, 2010).

Para combater essa bactéria normalmente são administrados ao paciente antibióticos. Portanto essas bactérias estão tendo a capacidade de adquirir resistência a esses antibióticos devido ao seu uso rotineiro. Assim, novas técnicas para combatê-las estão sendo desenvolvidas, como a TFD (PELOI, 2007).

5. CROMATOGRAFIA DE PAPEL APLICADA AO ENSINO MÉDIO

A Química sempre foi e tem se tornado cada vez mais importante no dia a dia das pessoas. O que antes era apenas considerado interesse de cientistas e químicos, hoje também tem sido interesse de cidadãos de todo o mundo.

A aplicação de práticas que ilustrem a teoria consegue despertar o interesse da maioria dos alunos, principalmente se forem relacionadas com o cotidiano.

A cromatografia é um método de análise que tem a finalidade de efetuar separações, permitindo identificar e quantificar variadas misturas de compostos químicos (FRACETO, 2003).

A palavra cromatografia deriva do grego “chrom” (cor) e “graphe” (escrever) (FRACETO, 2003).

Os métodos cromatográficos são utilizados para separar misturas contendo duas ou mais substâncias, e baseiam-se na distribuição diferencial dessas substâncias entre duas fases: uma estacionária e a outra móvel (RIBEIRO, 2008).

Um dos métodos conhecidos é possível separar algumas misturas em cerca de minutos com papel e água. Quando o papel é usado na separação de uma mistura, a técnica é conhecida como cromatografia de papel (GEOCITIES, 2010).

É uma técnica de partição líquido–líquido, onde um deles está fixado a um suporte sólido. Baseia-se na diferença de solubilidade das substâncias entre duas fases imiscíveis, sendo geralmente a água um dos líquidos. O solvente é saturado em água e a migração se dá ao fato que o papel de celulose (papel de filtro) contém água. Este método é muito útil para a separação de compostos polares, sendo largamente usado em bioquímica (DEGANI, 1998).

A cromatografia de papel funciona quando as moléculas possuem uma propriedade chamada polaridade. Uma molécula polar possui uma região rica em elétrons e uma outra região que é pobre em elétrons, são representadas como sendo negativamente e positivamente carregadas, respectivamente. Moléculas polares são

unidas por forças de atração entre cargas opostas de moléculas diferentes. A molécula da água têm regiões ricas em elétrons nos átomos de oxigênio e regiões pobres em elétrons nos átomos de hidrogênio. Assim consequentemente a molécula de água polar organiza-se de maneira que a região de carga positiva é atraída pela carga negativa de outra (GEOCITIES, 2010).

Trata-se de uma técnica simples para análise de amostras em pequenas quantidades, aplicada principalmente na separação e identificação de compostos polares, tais como açúcares, anti-bióticos hidrossolúveis, aminoácidos, corantes, pigmentos e íons (RIBEIRO, 2008).

5.1 PARTE EXPERIMENTAL

A parte experimental é feita com poucos materiais, podendo ser encontrados em uma papelaria.

- Materiais

Papel sulfite ou de filtro; canetas coloridas de cores vivas (ponta porosa); frasco de vidro , 2 lápis, álcool, tesoura, papel alumínio, fita adesiva e régua.

- Procedimento

Cortar do papel sulfite ou de filtro uma tira de 6 cm de largura e 21 cm de comprimento. Enrolar a extremidade superior no lápis ou caneta de modo que a parte posterior não ultrapasse 3 cm e fixá-la com um pedaço de fita adesiva. Cortar o papel em um comprimento tal que sua extremidade inferior fique a aproximadamente 0,5 cm do fundo do frasco de vidro. Com um lápis, traçar na tira de papel uma linha de 1,5 cm acima da extremidade inferior. Fazer nessa linha as

marcas de canetas de 0,5 cm de diâmetro e distando 1 cm uma da outra. No frasco de vidro, adicionar 100 mL de álcool ou aproximadamente 1,5 cm de altura. Colocar a tira de papel preparada com o lápis ou a caneta apoiada no frasco e cuidar para que a camada de álcool fique próxima, mas não molhe inicialmente as marcas de tinta. Tampar o frasco com a folha de papel alumínio. Observar o papel à medida que o álcool sobe e anotar as observações.

Assim como as canetas apresentam pigmentos de colorações diferentes que podem ser utilizados em cromatografias de papel, também existem corantes que podem ser utilizados na área da saúde ajudando a curar feridas, cânceres ou até mesmo matar microorganismos tais como bactérias e fungos.

O azul de metileno faz parte dessa classe de corantes que além de ser um pigmento que tinge tecidos e roupas, também atua como um fotossensibilizador ativado por uma luz num comprimento de onda adequado resultando na morte dos tecidos doentes.

6. METODOLOGIA

6.1 MATERIAIS E SOLUÇÕES

- *Escherichia coli*
- Solução CMH (Caldo Muller Hinton) SYNTH; MERCK; DIFCO
- Solução fisiológica (NaCl 0,9%, m/v) NUCLEAR; peptonada (0,1%, m/v) SYNTH
- Solução de salina estéril (NaCl 0,9%, m/v) NUCLEAR
- Corante Azul de metileno QUIMEX
- Balão Volumétrico de 500 mL
- Balão Volumétrico de 100 mL
- Balão Volumétrico de 25 mL
- Tubos de ensaio
- Pipeta de Pasteur
- Micropipeta

6.2 EQUIPAMENTOS

- Autoclave Vertical, PHOENIX AV - 30
- Centrifuga, CELM COMBATE
- Estufa bacteriológica, TECNAL TE – 398/2
- Espectrofotômetro, FEMTO 700 plus

- Balança Analítica, GEHAKA AG 200

- LEDs (Everlight co) 5 mWatts (cor vermelha)

6.3 PROCEDIMENTO

A bactéria Escherichia coli foi mantida no ágar EMB e conservadas no refrigerador a 9ºC. O microrganismo foi crescido em caldo Muller Hinton (CMH) a 37ºC por aproximadamente 15 horas, em estufa bacteriológica. O microrganismo foi suspendido em centrifuga a 3000 rpm por 15 minutos; o sobrenadante foi descartado e o concentrado de inóculo foi ressuspenso e lavado com soro fisiológico peptonado, repetindo-se o procedimento por mais duas vezes. O inóculo foi ressuspendido com solução fisiológica e calibrado em espectrofotômetro a 580 nm em transmitância de 25-30%. Desta suspensão foi realizada a diluição de 1:20 em solução fisiológica.

A experiência foi realizada com dois grupos: um exposto à luz e o outro mantido no escuro. Os grupos controle foram realizados como: um misturando 400µL do inóculo e 100µL de salina estéril (controle positivo), e o outro 100µL AM + 400µL de CMH, sem microrganismo (controle negativo). Os grupos testes foram preparados adicionando 100µL do AM, em diferentes concentrações, com 400µL do inóculo calibrado em 4 tubos de ensaio.

A iluminação foi realizada diretamente sobre os tubos de ensaio, utilizando LEDs como fonte, durante 30 minutos. Após a iluminação, completou-se o vomule até 4,0 mL com CMH. As amostras foram incubadas em estufa bacteriológica a 37ºC. Foi quantificada a taxa de crescimento em espectrofotômetro e a porcentagem de transmitância (%T) em 580 nm foi medido em 0, 2, 4 e 6 horas. Durante todo o experimento o meio de cultura e todas as soluções foram autoclavadas por 20 minutos a 120 ºC antes de serem utilizadas.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para verificar o efeito do azul de metileno sem irradiação no crescimento bacteriano, e portanto, sem a geração de $^1O_2$, bactérias foram incubadas em concentrações crescentes de AM.

Figura 15. Amostras em crescente concentração de Azul de metileno.

No tubo 1 foi adicionado 400 µL do inóculo + 100 µL de salina estéril; no tubo 2 foi adicionado 100 µL de AM + 400 µL do CMH sem bactéria; no tubo 3 foi adicionado 400 µL do inóculo + 100 µL de AM de concentração 35,2 µmol.L^{-1}; no tubo 4 foi adicionado 400 µL do inóculo + 100 µL de AM de concentração 70,4 µmol.L^{-1}; no tubo 5 foi adicionado 400 µL de inóculo + 100 µL de AM de concentração 105,6

µmol.L^{-1} e no tubo 6 foi adicionado 400 µL do inóculo + 100 µL de AM de concentração 140,8 µmol.L^{-1}.

O resultado é apresentado na figura 16. Para comparação, é apresentado o resultado obtido por Peloi (2007) na figura 17.

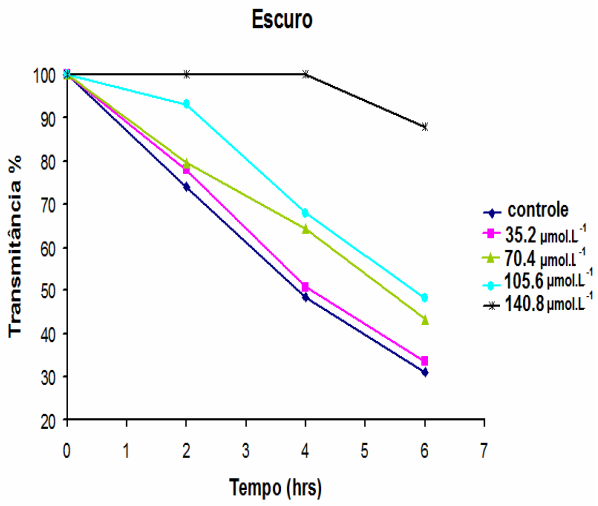

Figura 16. Curva de inibição de crescimento em diversas concentrações de AM sem luz.

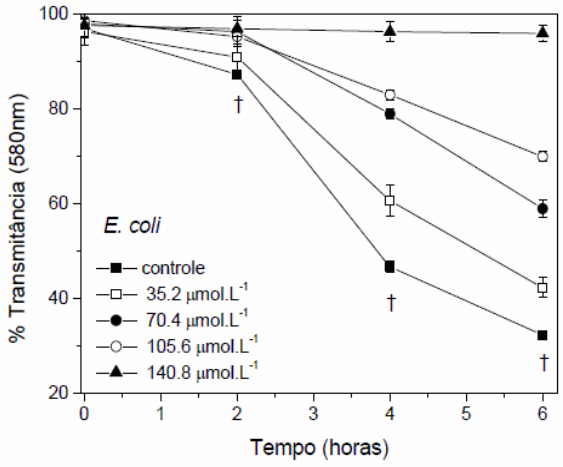

Figura 17. Curva de inibição de crescimento em diversas concentrações de AM sem luz. (In: PELOI, 2007, p. 45)

O aumento na concentração de AM aumentou a inibição do crescimento, semelhante ao experimento feito por Peloi (2007). No entanto, para Peloi o efeito de cada concentração na inibição de crescimento foi mais eficiente após 6 horas. (figura 17). Na concentração de AM de 140,8 µmol/L Peloi (2007) obteve inibição do crescimento durante as 6 horas de análise, o que não ocorreu com o experimento realizado, na figura 16, onde a transmitância obtida em 6 horas indica que a bactéria começou a crescer.

A figura 18 e 19 ilustra o crescimento bacteriano após irradiação por 30 minutos em crescentes concentrações de AM.

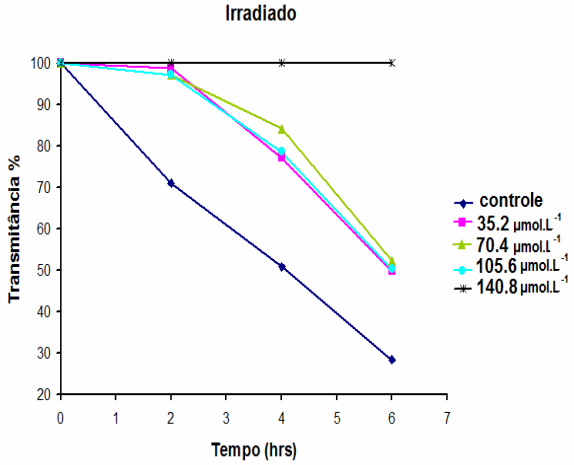

Figura 18. Curva de inibição de crescimento em diversas concentrações de AM após a irradiação.

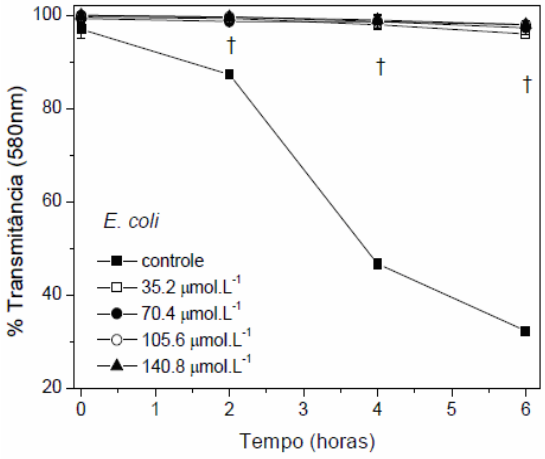

Figura 19. Curva de inibição de crescimento em diversas concentrações de AM após a irradiação. (In: PELOI, 2007, p. 45)

A figura 18 demonstra que após a irradiação por 30 minutos para as diferentes concentrações de azul de metileno houve uma pequena inibição do crescimento bacteriano. Entretanto Peloi (2007) obteve inibição completa do crescimento bacteriano para todas as concentrações durante as 6 horas.

A figura 16 e 18 nota-se o crescimento bacteriano em ambos os gráficos.

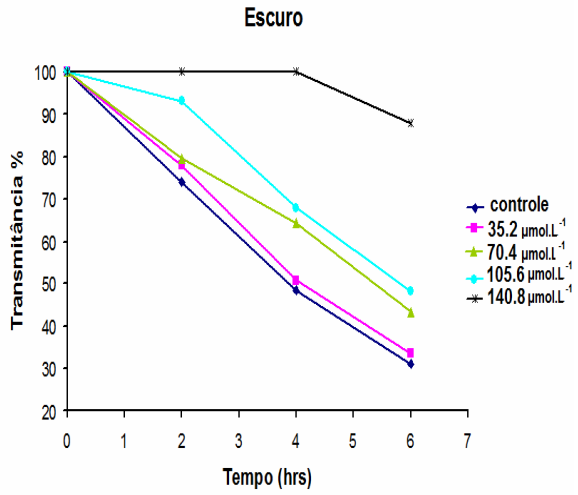

Figura 16. Curva de inibição de crescimento em diversas concentrações de AM sem luz.

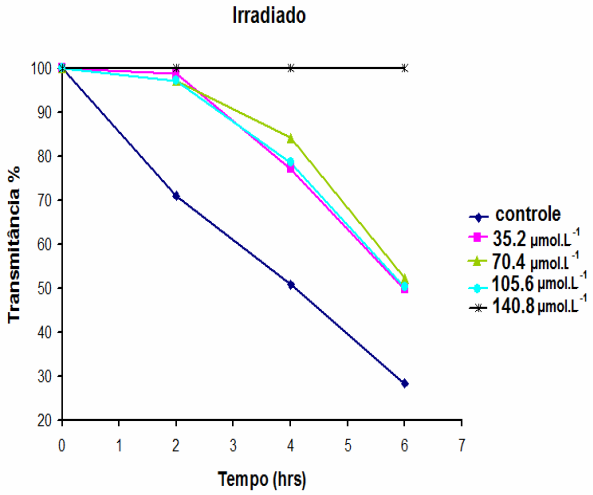

Figura 18. Curva de inibição de crescimento em diversas concentrações de AM após a irradiação.

Ao comparar os experimentos feitos, sem luz e com irradiação por LEDs, é possível observar que os gráficos durante as 2 primeiras horas é encontrado um perfil de inibição semelhante ao experimento feito por Peloi (2007), com pouca variação de %T, em torno de 100%, entretanto após as 2 horas é notado o crescimento bacteriano da *Escherichia coli*.

Peloi (2007) realizou estes experimentos utilizando uma mesa de agitação. Este sistema permite uma melhor capacidade de distribuição do oxigênio singlete gerado. A falta de agitação dos tubos de ensaio no experimento da figura 18 pode explicar a diferença obtida. Outra dificuldade encontrada foi o posicionamento correto dos LED's sobre os tubos.

A figura 20 ilustra o posicionamento dos LED’s sobre as amostras.

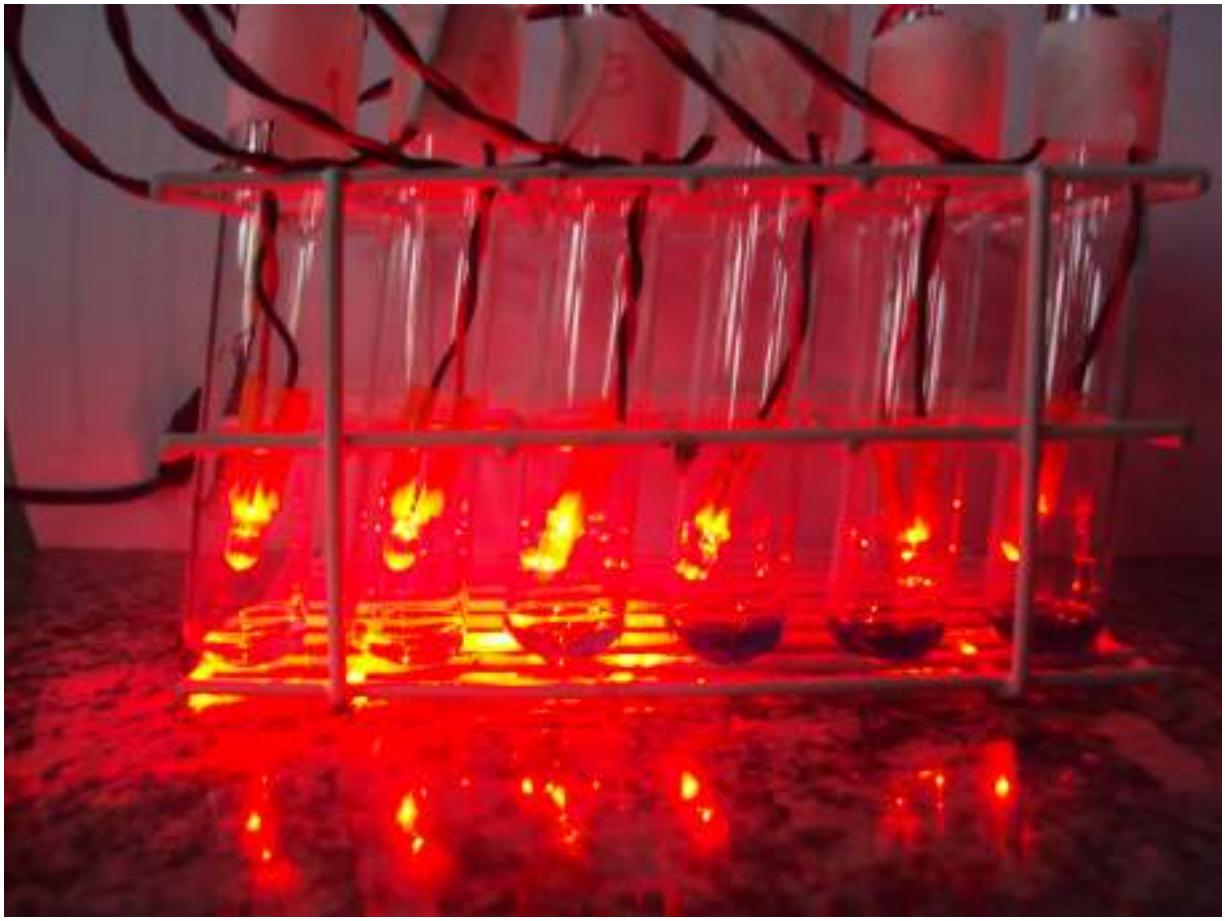

Figura 20. Posicionamento dos LED’s sobre as amostras

Como pode-se verificar na figura 20, os LED’s não estão posicionados exatamente no meio do tubo. Deste modo, a parte da solução mais próxima do LED irá gerar mais oxigênio singlete do que a mais distante. A falta de agitação torna menos eficiente o ataque do oxigênio singlete às bactérias.

8. CONCLUSÃO

Através dos dados obtidos pode-se concluir que o AM inibiu o crescimento bacteriano tanto no experimento feito no escuro quanto no experimento irradiado.

A irradiação do AM aumentou a inibição do crescimento devido a geração do oxigênio singlete, mas devido a ausência de agitação e de posicionamento dos LED's prejudicaram a observação mais nítida do efeito fotodinâmico nas concentrações crescentes de AM.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, Itajaí Oliveira de. **Citotoxicidade *In vitro* da Terapia Fotodinâmica com Alumínio Cloro – Ftalocianina Lipossomal em Melanoma Murino (B16F10).** 2008. 66p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

ALVES, Adriana Maria Campos; MAGALHÃES, Carina Salomé Seara; OLIVEIRA, Joana Filipa. **Evolução da Resistência da bactéria Escherichia coli aos antibióticos**. 2010. Escola Cooperativa Vale São Cosme. Disponível em: < www.darwin2009.pt/img/.../Grupo%20-%20%20As%20Borboletas(2).pdf>. Acesso em 8 jul.2010.

BUCK, Suélen Tadéia Gasparetto. **Relação entre Eficiência Fotodinâmica, Citotoxicidade e propriedades moleculares de corantes para aplicação em Terapia Fotodinâmica.** 2009. 93p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Paulo, São Carlos, 2009.

DEGANI, Ana Luiza G.; CASS, Quezia B.; VIEIRA, Paulo C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, Maio, 1998. p. 21-25.

FERNANDES, Adjaci Uchoa. **Síntese, caracterização e fotoatividade de fotossensibilizadores derivados de Protoporfirina IX e de Clorofilina.** 2007. 223p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2007.

FRACETO, Leonardo Fernandes; LIMA, Sílvio Luís Toledo de. Aplicação da Cromatografia em Papel na Separação de Corantes em Pastilhas de Chocolate. **Química Nova na Escola**, n. 18, Novembro, 2003. p. 46-48.

GABRIELLI, Dino Santesso. **Eficiência fotodinâmica dos fenotiazínicos em mitocôndrias e células tumorais.** 2007. 68p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GEOCITIES. **Cromatografia**. Disponível em: <http://geocities.yahoo.com.br/chemicalnet/cromatografia.htm#cromatografia>. Acesso em 19 Out. 2010.

GONZALES, Fernanda Pereira. **Triagem, identificação e determinação de parâmetros funcionais de fotossensibilizadores com ação antifúngica.** 2007. 130p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

MACHADO, Antonio Eduardo da Hora. Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas. **Química Nova**, v.23, n.2, março/abril, 2000. p. 237-243.

MARINHO, Sandra Aparecida. **Efeito da Terapia Fotodinâmica (PDT) sobre culturas de *Candida sp.* e de células epiteliais: Estudo *in vitro*.** 2006. 163p. Tese (Doutorado) – Área de Concentração em Estomatologia Clínica – Faculdade de Odontologia, Porto Alegre, 2006.

MENEZES, Priscila Fernanda Campos de. **Estudos Espectrocóspicos e Citotóxicos do Photogem® Fotodegradado e dos Fotoprodutos formados pela Irradiação com Laser.** 2006. 182p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Paulo, São Carlos, 2006.

PAOLI, Vania Maria de. **Terapia Fotodinâmica aplicada à erradicação de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*: avaliação *in vitro* da eficiência de diferentes fármacos fotossensíveis**. 2005. p.200. Tese (Doutorado) – Departamento de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

PELOI, Lilian Somenci**. Estudos da aplicação do corante azul de metileno em Terapia Fotodinâmica**. 2007. 83p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química – Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Maringá, 2007.

PERUSSI, Janice Rodrigues. Inativação Fotodinâmica de Microorganismos. **Química Nova**, v.30, n.4, jul/ago, 2007, p.988-994.

RIBEIRO, Núbia Moura; NUNES, Carolina Rodeiro. Análise de Pigmentos de Pimentões por Cromatografia em Papel. **Química Nova na Escola**, n. 29, Agosto, 2008. p. 34-37.

SANTOS, Renata Oliveira; OLIVEIRA, Carlos Alberto de; MENEZES, Henrique Dantas de. Avaliação Preliminar de Inativação Fotodinâmica de *Escherichia coli* utilizando Extrato *Bidens Sulphurea* e *Tagetes Rerecta*. **Histórico Científico**, v.1, n.10. 2009, p. 1-8.

SETÚBAL, Cristina Aparecida. **Procura de novos fotossensibilizadores para uso em Terapia Fotodinâmica**. 2007. 111p. Dissertação (Mestrado) – Área de Concentração: Físico-Química – Universidade Federal do Paraná, Paraná, Curitiba, 2007.

SILVA, Renato Cavalcante. **Avaliação da Eficiência Fotodinâmica de Fotossensibilizadores com aplicação em Terapia Fotodinâmica**. 2007. 90p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Paulo, São Carlos, 2007.

SIMPLICIO, Fernanda Ibanez; MAIONCHI, Florângela; HIOKA, Noboru. Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, Aplicações e Avanços Recentes no Desenvolvimento de Medicamentos. **Química Nova**, v.25, n.5, set/out, 2002. p. 801-807.

SKOOG, Douglas A.; HOLLER, F. James; NIEMAN, Timothy A. **Princípios de Análise Instrumental**, 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SOARES, Rafael Ribeiro da Silva. **Estudo de propriedades da Clorofila a e da Feofitina a visando a Terapia Fotodinâmica**. 2006. p.92. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química – Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Maringá, 2006.

WIKIPEDIA. **Azul de metileno**. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Azul_de_metileno>. Acesso em 20 jul. 2010.

WIKIPEDIA. **Escherichia coli**. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli> . Acesso em 01 jul. 2010.