

Terapia fotodinâmica como uma alternativa para combate a *Escherichia coli*: uma abordagem experimental

Photodynamic therapy as an alternative for combating Escherichia coli: an experimental approach

Laura Junqueira Barbosa¹

¹Curso de Biomedicina da Universidade Paulista – UNIP, São Paulo – SP, Brasil.

Resumo

Objetivo – Avaliar a ação fotoinativadora da TFD sobre *E. coli* em suspensão planctônica, empregando os fotossensibilizadores *Hypericum perforatum* e azul de metileno (AM), na presença ou ausência de irradiação por LED vermelho. A *Escherichia coli* é um bacilo gram-negativo que integra a microbiota intestinal, mas algumas cepas podem causar infecções oportunistas. Com o aumento de cepas resistentes entre enterobactérias, cresce a preocupação quanto à eficácia dos antimicrobianos, destacando a Terapia Fotodinâmica (TFD) como alternativa promissora. O método consiste em associar um fotossensibilizador a uma fonte luminosa de baixa intensidade, promovendo a geração de espécies reativas de oxigênio capazes de induzir danos celulares irreversíveis. **Métodos** – Foram preparadas suspensões bacterianas padronizadas e submetidas aos tratamentos com AM (0,05% e 0,1%) e *H. perforatum* (2,5% e 5%), com ou sem exposição luminosa (660 nm, 10 min). Após os tratamentos, realizaram-se diluições seriadas e semeadura em ágar MacConkey para quantificação de unidades formadoras de colônias. **Resultados** – Os controles salino e do diluente apresentaram crescimento microbiano em todas as repetições. O AM associado à irradiação resultou em ausência completa de colônias a partir dos tratamentos com luz, enquanto as amostras tratadas com AM sem luz exibiram crescimento reduzido. Já *H. perforatum*, independentemente da presença de luz, não demonstrou efeito bactericida, apresentando crescimento expressivo em todas as condições. **Conclusão** – A TFD mediada por azul de metileno mostrou ação microbicida eficaz contra *E. coli*, enquanto o extrato de *Hypericum perforatum* não apresentou atividade significativa nas condições experimentais testadas, reforçando o AM como fotossensibilizador eficiente no controle de bactérias Gram-negativas.

Descritores: *Escherichia coli*; Infecções por *Escherichia coli*; Terapia fotodinâmica; Azul de metileno

Abstract

Objective – To evaluate the photoinactivation action of ATFD on *E. coli* in planktonic suspension using the photosensitizers *Hypericum perforatum* and methylene blue (MB), in the presence or absence of red LED irradiation. *Escherichia coli* is a Gram-negative bacillus that normally inhabits the human intestinal microbiota, but pathogenic strains can cause opportunistic infections. The rise of resistant strains has increased concerns about antimicrobial efficacy, making Photodynamic Therapy (PDT) a promising therapeutic alternative. The method consists of combining a photosensitizer with a low-intensity light source, promoting the generation of reactive oxygen species capable of inducing irreversible cellular damage. **Methods** – Standardized bacterial suspensions were prepared and subjected to treatments with MB (0.05% and 0.1%) and *H. perforatum* (2.5% and 5%), with or without light exposure (660 nm, 10 min). After treatment, serial dilutions were performed followed by plating on MacConkey agar for colony-forming unit quantification. **Results** – Both saline and solvent controls showed microbial growth in all replicates. MB combined with irradiation resulted in complete absence of colonies, whereas samples treated with MB without light exhibited reduced growth. In contrast, *H. perforatum*, regardless of light exposure, did not demonstrate bactericidal activity and showed expressive growth under all conditions. **Conclusion** – PDT mediated by methylene blue demonstrated effective microbicidal action against *E. coli*, whereas *Hypericum perforatum* extract showed no significant activity under the experimental conditions tested, reinforcing MB as an efficient photosensitizer for controlling Gram-negative bacteria.

Descriptors: *Escherichia coli*; Photodynamic therapy; *E. coli* infections; Methylene blue

Introdução

Escherichia coli é um bacilo gram-negativo, anaeróbio facultativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae* que comumente vive comensalmente na microbiota intestinal humana. Algumas cepas patogênicas são responsáveis por infecções oportunistas, como infecções do trato urinário, sepsse ou meningite neonatal.^{1,2}

O crescente número de cepas resistentes entre enterobactérias tem elevado a preocupação quanto à eficácia dos antimicrobianos atualmente disponíveis. O fenótipo de resistência resulta da expressão de diversos mecanismos moleculares, incluindo a produção de enzimas inativadoras, alterações no sítio-alvo e modificações na permeabilidade da membrana, como redução da entrada ou aumento da extrusão de fármacos.³

Nesse contexto, a Terapia Fotodinâmica (TFD) tem se destacado como uma alternativa terapêutica promissora. A técnica utiliza um fotossensibilizador (FS) biologicamente seguro que, ao ser ativado por luz visível de baixa intensidade na presença de oxigênio, gera espécies reativas capazes de danificar estruturas celulares essenciais.⁴ O interesse na TFD aplicada à microbiologia tem aumentado significativamente devido ao crescimento de cepas bacterianas altamente resistentes aos antibióticos convencionais.⁵ Uma de suas principais vantagens é a baixa probabilidade de desenvolvimento de resistência, atribuída à multiplicidade de alvos oxidativos envolvidos no processo.⁴

A eficácia da TFD depende diretamente da capacidade do fotossensibilizador de se acumular seletivamente no local da infecção, bem como de sua distribuição

adequada nos tecidos e da possibilidade de iluminação eficiente da região-alvo. Além disso, o desempenho da técnica está relacionado às propriedades fotofísicas do FS e à forma como ele se localiza, se incorpora e interage com as estruturas celulares. Para exercer sua ação, deve inicialmente associar-se à superfície celular ou atravessar a membrana plasmática, processos que podem ocorrer por difusão passiva, transporte ativo ou mecanismos dependentes de endocitose.^{4,5}

Após a absorção da luz, o FS atinge um estado excitado e pode retornar ao estado basal emitindo fluorescência; entretanto, a ação fotodinâmica efetiva ocorre quando a molécula migra para o estado tripleto. Nesse estado, ele pode seguir dois caminhos principais. No mecanismo Tipo I, ocorrem reações de transferência de elétrons ou hidrogênio com moléculas vizinhas, resultando na formação de radicais livres. No mecanismo Tipo II, a energia do FS excitado é transferida diretamente ao oxigênio molecular, produzindo oxigênio singleto (1O_2), considerado a espécie reativa mais relevante para a inativação microbiana.^{6,7}

O oxigênio singleto apresenta alta reatividade e interage com diversos componentes celulares, sobretudo compostos orgânicos insaturados. Como a primeira barreira encontrada por essa espécie é a membrana plasmática — rica em lipídios insaturados — sua oxidação leva a danos estruturais, formação de hidroperóxidos e subsequente geração de outras espécies reativas de oxigênio (EROs). A ação dessas espécies é inespecífica, de modo que qualquer macromolécula celular pode se tornar alvo do processo fotodinâmico, contribuindo para a inviabilização celular. Essa multiplicidade de alvos reduz a probabilidade de desenvolvimento de resistência microbiana.^{6,7}

O Azul de Metileno (AM) figura entre os fotossensibilizadores mais antigos empregados na Terapia Fotodinâmica, com relatos de sua ação fotodinâmica datados da década de 1930, tem sido objeto de intensa investigação e uso clínico, mostrando-se altamente eficaz na inativação de diversos patógenos, como vírus, bactérias e leveduras. É um corante de estrutura aromática heterocíclica, capaz de se dissolver tanto em água quanto em álcool, mas caracterizado por ser mais hidrofílico. Do ponto de vista fotodinâmico, destaca-se por apresentar um rendimento quântico de oxigênio singleto próximo de 0,5, o que significa que cerca de metade das moléculas excitadas pela luz conseguem gerar essa espécie reativa, considerada essencial para a ação antimicrobiana e citotóxica na TFD. Além disso, o composto possui baixo potencial de redução, característica que facilita as reações de transferência de elétrons envolvidas nos mecanismos fotoquímicos que ocorrem após sua ativação luminosa.⁸

Hypericum perforatum (HP), popularmente conhecida como erva-de-são-jão e pertencente à família *Hypericaceae*, tem seu uso amplamente documentado, com relatos que remontam a mais de 2.400 anos e referências às suas propriedades cicatrizantes desde o século V a.C. A espécie apresenta

importantes características biológicas e químicas, sendo tradicionalmente empregada no tratamento de infecções, conforme registrado em estudos etnobotânicos.⁹⁻¹¹ Embora, em tempos recentes, o destaque atribuído a *H. perforatum* esteja principalmente relacionado ao seu potencial antidepressivo, somente nos últimos anos sua atividade antimicrobiana passou a ser investigada de forma mais sistemática, abrangendo diferentes cepas bacterianas e fúngicas. A literatura indica que sua ação antibacteriana é mais pronunciada contra bactérias Gram-positivas do que contra Gram-negativas. Ademais, pesquisas demonstram que extratos preparados em solventes alcoólicos, como metanol e etanol, apresentam maior eficácia antimicrobiana quando comparados aos extratos aquosos.^{9,10}

O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da TFD na inativação de *Escherichia coli* em meio planctônico, empregando dois fotossensibilizadores de naturezas distintas: Azul de Metileno e extrato de *Hypericum perforatum*. Buscou-se determinar a atividade microbida desses compostos quando associados à irradiação com LED vermelho, verificando sua capacidade de promover a inativação bacteriana sob diferentes condições experimentais. Observando a influência da ativação luminosa e as possíveis limitações físico-químicas dos fotossensibilizadores.

Constatou-se que o Azul de Metileno, quando associado à irradiação com LED vermelho, apresentou ação microbida robusta, resultando em completa inativação de *Escherichia coli* em meio planctônico. Em contraste, o extrato de *Hypericum perforatum* não exibiu atividade antimicrobiana significativa nas condições experimentais avaliadas, independentemente da presença de luz. Esses resultados reforçam o potencial do Azul de Metileno como fotossensibilizador eficaz no controle de microrganismos e, destacam a importância de investigações adicionais para avançar TFD em microorganismos mais resistentes.

Métodos

O presente estudo foi desenvolvido em ambiente laboratorial com delineamento quantitativo. Por não envolver direta ou indiretamente seres humanos, a pesquisa está isenta de aprovação por Comitê de Ética, conforme Resolução nº 510/2016 do Conselho Nacional de Saúde. Foi utilizada uma cepa de campo *Escherichia coli* para a realização deste estudo. Foram utilizados como fotossensibilizantes o extrato de *Hypericum perforatum* e o azul de metileno. Foram analisados grupos com e sem exposição luminosa, permitindo comparar o efeito fotodinâmico e o efeito antimicrobiano basal dos compostos.

Preparo dos fotossensibilizantes

Dois fotossensibilizantes foram avaliados: azul de metileno (AM) e extrato de *Hypericum perforatum* (HP). Ambos foram adquiridos na forma pó e preparados no laboratório imediatamente antes dos experimentos.

O AM foi dissolvido em solução salina estéril (NaCl 0,9%) nas concentrações finais de 0,05% e 0,1%. O HP foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) 5%, nas concentrações finais de 2,5% e 5%.

Todas as soluções foram homogeneizadas em homogeneizador de tubos, assegurando completa solubilização e estabilidade das partículas em suspensão. Os fotossensibilizantes foram preparados sob condições controladas de luminosidade e armazenados envoltos em papel-alumínio, a fim de evitar qualquer degradação fotoquímica prévia.

Preparo da suspensão bacteriana

Foi utilizada uma cepa selvagem de *Escherichia coli*, previamente identificada e confirmada por coloração de Gram, na qual se observaram bacilos Gram-negativos característicos. A escolha de uma cepa de

origem selvagem permitiu avaliar a eficácia da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) em condições próximas às encontradas em isolados clínicos, evitando possíveis vieses associados a cepas laboratoriais excessivamente adaptadas.

A suspensão inicial de *E. coli* foi ajustada para uma concentração aproximada de 10⁷ UFC/mL, obtida a partir de cultura fresca. A densidade celular foi padronizada por leitura espectrofotométrica em 590 nm, alcançando absorvância de 0,368, valor selecionado com base em curvas de calibração previamente estabelecidas no laboratório, conforme pode ser observado no quadro 1.

Essa suspensão bacteriana ajustada foi utilizada para inocular os poços das microplacas de 96 poços, compondo o volume final experimental de 100 µL por poço.

Quadro 1. Escala de McFarland padronizada em espectrofotometria 10⁷ células/mL

Micro-organismo	Comprimento de onda (nm)	Densidade óptica (DO)	UFC/mL
<i>Escherichia coli</i>	590	0,362	10 ⁷

Fonte: Unesp, 2025

Organização experimental e grupos de tratamento

Foram utilizadas placas de 96 poços, distribuídas entre quatro condições experimentais principais: AM com luz, AM sem luz, HP com luz, HP sem luz. Cada condição foi realizada em duas concentrações de fotossensibilizante e em duplicata, totalizando um conjunto de repetições para análise. Além disso, estabeleceram-se dois grupos controle, o A1 sendo controle do NaCl 0,9% mais a suspensão bacteriana (SB), e o controle A2 como controle do solvente. Os controles permitiram verificar viabilidade bacteriana, ausência de efeito antimicrobiano do solvente, manutenção da fisiologia da cepa nas condições experimentais.

Os poços das placas de 96 poços foram preparados da seguinte forma:

• AM com e sem luz

- A1 – Grupo controle (100 µL de SB + 100 µL NaCl 0,9%)
- A2 – Grupo controle (100 µL SB + 100 µL NaCl 0,9%)
- A3, A4 – 100 µL de SB + 100 µL AM 0,05%
- A5, A6 – 100 µL de SB + 100 µL AM 0,1%
- B, C, D, E – 90µL de NaCl 0,9%

• HP com e sem luz

- A1 – Grupo controle (100 µL de SB + 100 µL NaCl 0,9%)
- A2 – Grupo controle (100 µL SB + 100 µL DMSO 5%)
- A3, A4 – 100 µL de SB + 100 µL HP 2,5%
- A5, A6 – 100 µL de SB + 100 µL HP 5%
- B, C, D, E – 90 µL de NaCl 0,9%

Irradiação e condições de luz

A TFD foi realizada em uma mesa irradiadora de LED vermelho, com emissão em 660 nm, 1 J/cm². A câmara irradiadora possui abertura frontal para inserção de uma placa por vez, garantindo exposição homogênea aos LEDs distribuídos horizontalmente sobre toda a superfície da microplaca.

Os grupos designados para irradiação foram expostos por 10 minutos, tempo previamente estabelecido como suficiente para ativação dos fotossensibilizantes testados. As placas destinadas aos grupos “sem luz” foram protegidas com papel alumínio, evitando qualquer entrada de radiação ambiental e servindo como controle da ação não-fotoativada dos compostos.

Não foi adotado tempo de repouso entre o fim da irradiação e o início das diluições seriadas, evitando interferência de variações temporais na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Diluições seriadas e semeadura

Após os tratamentos, realizaram-se diluições seriadas 1:10 diretamente nos poços da placa de microtitulação, conforme descrito.

Foi transferido 10 µL sequencialmente de um poço para o seguinte (A1-B1-C1-D1-E1) que já continham 90 µL de NaCl 0,9% até alcançar a fileira E, que representou a maior diluição.

Repetição do processo nas colunas A1-A6.

Completada a diluição seriada, foi pipetado 100 µL da fileira E de cada coluna em uma placa de Petri com Ágar MacConkey, a solução foi semeada uniformemente com o auxílio de alça de Drigalski.

Seguida de incubação por 24 h a 37 °C em uma estufa destinada ao crescimento microbiano.

Após o período de incubação, realizou-se a contagem de unidades formadoras de colônia e realizado o cálculo de UFC/mL, utilizando técnicas microbiológicas padronizadas.

Confirmação da identidade bacteriana

Para garantir que o crescimento observado correspondia à *E. coli*, aplicou-se a coloração de Gram às colônias obtidas, confirmando:

- morfologia bacilar,
- coloração característica de bactérias Gram-negativas,
- ausência de contaminantes que pudessem interferir no resultado.

As colônias provenientes dos controles e dos grupos tratados com *Hypericum perforatum* apresentaram morfologia típica, sem alterações estruturais visíveis.

Análise dos dados

Foram calculados os valores de UFC/mL para cada condição experimental, permitindo comparar:

- eficácia dos fotossensibilizantes,
- impacto da irradiação,
- diferenças entre concentrações,
- consistência dos resultados entre duplicatas.

Os dados foram registrados em planilhas analíticas e comparados entre si para caracterização da atividade antimicrobiana.

Resultados

A análise quantitativa da viabilidade bacteriana, expressa em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), revelou resultados distintos entre os controles e os grupos tratados com Azul de Metileno (AM) e *Hypericum perforatum* (HP), tanto na presença quanto na ausência da irradiação luminosa. Os resultados foram obtidos a partir da semeadura de 100 µL de cada suspensão experimental, permitindo o cálculo final por meio da conversão padrão: número de colônias contadas na placa vezes fator de diluição, resultado dividido pelo volume semeado.

Azul de Metileno (AM) – Controles E1 e E2

Os controles negativos apresentaram crescimento bacteriano relativamente elevado, compatível com a ausência de qualquer intervenção antimicrobiana. O controle A1 (NaCl 0,9% + SB) demonstrou valores de $1,3 \times 10^3$ UFC/mL na presença de luz e $1,8 \times 10^3$ UFC/mL sem luz. O controle A2 (NaCl 0,9% como solvente + SB) apresentou valores próximos, variando entre $1,8 \times 10^3$ UFC/mL (sem luz) e $1,8 \times 10^3$ UFC/mL (com luz), indicando que tanto o NaCl 0,9% quanto o processo de diluição não exerceram impacto inibitório significativo sobre as células bacterianas.

AM 0,05% (A3-A4)

As amostras tratadas com 0,05% de Azul de Metileno (AM 0,05%) revelaram um efeito antimicrobiano dependente de luz. Na presença de irradiação (AM E3+ e AM E4+), observou-se completa inativação bacteriana, com valores iguais a 0 UFC/mL. Contudo, na ausência de luz (AM E3– e AM E4–), a viabilidade bacteriana variou de $5,8 \times 10^2$ a $8,2 \times 10^2$ UFC/mL, indicando que o fotossensibilizante, na concentração de 0,05%, não apresenta atividade relevante sem a ativação luminosa.

AM 0,1% (A5-A6)

Da mesma forma, a concentração de 0,1% de AM (A5–A6) demonstrou fotoinativação total quando submetida à luz, registrando 0 UFC/mL em ambas as réplicas. Sem luz, contudo, o crescimento permaneceu detectável ($3,8 \times 10^2$ a $5,0 \times 10^2$ UFC/mL). Esses achados reforçam o papel fundamental da luz na ativação fotodinâmica do Azul de Metileno, resultando em completa eliminação bacteriana nos grupos irradiados, independentemente da concentração testada.

Em síntese, o crescimento observado utilizando azul de metileno pode ser visualizado nos quadros 2 e 3.

Quadro 2. Azul de Metileno com Luz (AM E+)

Amostra	Colônias	UFC/mL
AM E1+	130	$1,3 \times 10^3$
AM E2+	180	$1,8 \times 10^3$
AM E3+	0	0
AM E4+	0	0
AM E5+	0	0
AM E6+	0	0

Fonte: Próprio autor, 2025

Quadro 3. Azul de Metileno sem Luz (AM E–)

Amostra	Colônias	UFC/mL
AM E1–	180	$1,8 \times 10^3$
AM E2–	116	$1,16 \times 10^3$
AM E3–	58	$5,8 \times 10^2$
AM E4–	82	$8,2 \times 10^2$
AM E5–	38	$3,8 \times 10^2$
AM E6–	50	$5,0 \times 10^2$

Fonte: Próprio autor, 2025

Hypericum perforatum (HP) – Controles E1 e E2

Os controles de HP indicaram que o NaCl 0,9% (A1) e o DMSO 5% (A2) não apresentaram ação inibitória significativa por si só. Na presença de luz, as contagens variaram entre $9,6 \times 10^2$ e $2,4 \times 10^3$ UFC/mL, enquanto sem luz os valores oscilaram de $4,8 \times 10^2$ a $5,2 \times 10^2$ UFC/mL (A1) e chegaram a $4,5 \times 10^3$ UFC/mL (A2). Esse aumento observado em algumas réplicas sem luz sugere variabilidade natural de crescimento e confirma que o solvente empregado (DMSO 5%) não interfere negativamente na viabilidade bacteriana.

HP 2,5% (A3-A4)

As amostras tratadas com HP 2,5% apresentaram elevado crescimento tanto com quanto sem luz, diferindo substancialmente do comportamento observado com Azul de Metileno. Na presença de irradiação (HP E3+ e HP E4+), as contagens variaram entre $2,37 \times 10^3$ e $2,42 \times 10^3$ UFC/mL, indicando ausência de fotoinativação relevante. Sem luz, os valores oscilaram de $4,3 \times 10^3$ a $4,5 \times 10^3$ UFC/mL, sugerindo que, nesta concentração, o *Hypericum perforatum* não exerceu efeito antibacteriano mensurável, independentemente da luz.

HP 5% (A5-A6)

Os grupos expostos à concentração de 5% de HP (A5–A6) apresentaram comportamento semelhante. Na presença de luz, as contagens variaram de $1,36 \times 10^3$ a $4,0 \times 10^3$ UFC/mL, enquanto sem luz permaneceram entre $2,3 \times 10^3$ e $4,5 \times 10^3$ UFC/mL. A ausência de redução expressiva em relação aos controles reforça que, nas condições avaliadas, o HP não demonstrou efeito antimicrobiano significativo, tampouco resposta fotodinâmica eficiente.

De forma resumida, o crescimento obtido com *H. perforatum* encontra-se apresentado nos quadros 3 e 4.

Quadro 4. *Hypericum perforatum* com Luz (HP E+)

Amostra	Colônias	UFC/mL
HP E1+	96	$9,6 \times 10^2$
HP E2+	240	$2,4 \times 10^3$
HP E3+	242	$2,42 \times 10^3$
HP E4+	237	$2,37 \times 10^3$
HP E5+	136	$1,36 \times 10^3$
HP E6+	400	$4,0 \times 10^3$

Fonte: Próprio autor, 2025

Quadro 5. *Hypericum perforatum* sem Luz (HP E-)

Amostra	Colônias	UFC/mL
HP E1–	48	$4,8 \times 10^2$
HP E2–	52	$5,2 \times 10^2$
HP E3–	430	$4,3 \times 10^3$
HP E4–	450	$4,5 \times 10^3$
HP E5–	230	$2,3 \times 10^3$
HP E6–	450	$4,5 \times 10^3$

Fonte: Próprio autor, 2025

Comparação Geral Entre os Fotossensibilizantes

A análise comparativa evidencia que o Azul de Metileno apresentou atividade fotodinâmica robusta, resultando em inativação completa das células bacterianas em ambas as concentrações testadas (0,05% e 0,1%) quando associado à irradiação luminosa. O efeito foi nitidamente dependente de luz, pois as mesmas concentrações sem irradiação apresentaram crescimento residual.

Por outro lado, o *Hypericum perforatum*, tanto em 2,5% quanto 5%, não demonstrou atividade antimicrobiana significativa, com ou sem luz, e os valores de UFC/mL permaneceram elevados em todas as réplicas, muitas vezes superiores aos controles.

De forma geral, os dados sugerem que, sob as condições experimentais estabelecidas, o AM se comportou como um fotossensibilizante eficaz para inativação bacteriana, enquanto o HP não apresentou desempenho satisfatório como agente fotodinâmico frente à cepa de *Escherichia coli* avaliada.

Discussão

A *Escherichia coli* é uma das bactérias mais estudadas e constitui um agente relevante de infecções graves tanto em ambientes hospitalares quanto comunitários.¹ Entre suas diversas linhagens, algumas cepas patogênicas estão associadas a quadros diarreicos e apresentam mecanismos moleculares complexos de resistência aos antibióticos, o que dificulta o tratamento e reforça a necessidade de alternativas terapêuticas, como a TFD.³

Nesse cenário, a TFD surge como uma estratégia promissora contra microrganismos resistentes. O método baseia-se na ativação de um fotossensibilizador (FS) por luz na presença de oxigênio, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) capazes de danificar componentes celulares essenciais das bactérias.⁴ A eficácia dessa abordagem depende diretamente das propriedades fotofísicas do FS, de sua

interação com a célula e de sua capacidade de se localizar e se incorporar adequadamente às estruturas celulares, como discutido por Castano, Demidova e Hamblin.⁵

Nos experimentos realizados, o Azul de Metileno (AM) apresentou fotoinativação completa das *E. coli* irradiadas, alcançando 0 UFC/mL em ambas as concentrações testadas (0,05% e 0,1%). Esse desempenho é compatível com a literatura, que descreve elevada eficiência de FS catiônicos contra bactérias Gram-negativas. Resultados semelhantes foram observados em estudos cinéticos de oxigênio singlete, nos quais o “new methylene blue” (NMB), um análogo do AM, apresentou localização em microambientes aquosos no interior de *E. coli* e produção eficiente de $^1\text{O}_2$.⁶

Ragàs *et al.* (2013) demonstraram que a produção e o decaimento de $^1\text{O}_2$ variam conforme o FS utilizado, influenciando sua distribuição e reatividade intracelular. Para o NMB, o ambiente predominantemente aquoso favorece a ação fotodinâmica, o que pode explicar a elevada eficácia observada para o AM após irradiação.⁶

Em contraste, o *Hypericum perforatum* (HP) não apresentou redução significativa da viabilidade bacteriana em nenhuma das condições avaliadas (2,5% e 5%, com ou sem luz). Apesar de seus compostos serem investigados por propriedades antimicrobianas, diversos estudos apontam que extratos de HP têm ação mais pronunciada contra bactérias Gram-positivas e que extratos alcoólicos apresentam melhor desempenho que extratos aquosos.⁹

A composição química complexa do HP pode dificultar a geração eficiente de EROs durante a TFD. Compostos como hiperforina, flavonoides e naftodiantronas não necessariamente apresentam comportamento fotofísico ideal para inativação de bactérias Gram-negativas, seja por baixa penetração na membrana externa, tendência à agregação ou localização celular desfavorável.⁹ Assim, para que o HP se torne uma alternativa viável na TFD, pode ser necessário empregar extratos alcoólicos, purificar compostos ativos (como hipericina ou hiperforina) ou otimizar a formulação a fim de aumentar sua atividade fotodinâmica.⁹

Além disso, embora o HP seja amplamente utilizado na fitoterapia, sua aplicação fotoativada exige cautela, devido ao potencial de gerar espécies citotóxicas capazes de induzir danos extensos às células.¹⁴ Estudos adicionais – como análises da cinética de $^1\text{O}_2$ semelhantes às realizadas por Ragàs *et al.* (2013) – seriam essenciais para esclarecer se a ausência de efeito observada decorre de produção insuficiente de $^1\text{O}_2$, de localização inadequada ou de agregação das moléculas presentes no extrato.¹¹

Também é relevante considerar que compostos naturais podem apresentar comportamentos distintos quando testados em diferentes modelos. Por exemplo,

Vollmer *et al.* (2019) observaram modificações em biofilmes orais tratados com HP associado a luz VIS+wIRA, indicando que, em sistemas mais complexos, certos efeitos podem emergir mesmo quando não há atividade expressiva em culturas planctônicas.¹² Isso reforça que um FS eficaz deve apresentar características químicas e fotofísicas adequadas — como carga, solubilidade, localização celular e capacidade consistente de produzir $^1\text{O}_2$ — as quais nem sempre estão presentes em extratos brutos.¹⁵

A busca por fotossensibilizadores mais eficientes, capazes de superar limitações observadas nas moléculas de primeira e segunda geração, permanece uma das principais estratégias para o aprimoramento da TFD.¹³

Em síntese, os resultados demonstram que o Azul de Metileno é um fotossensibilizador altamente eficaz para a fotoinativação de *E. coli* no modelo experimental adotado, enquanto o *Hypericum perforatum*, na forma testada, não apresentou efeito significativo. A literatura corrobora essa diferença: FS catiônicos como o AM tendem a gerar $^1\text{O}_2$ de forma eficiente em bactérias Gram-negativas, ao passo que extratos de HP apresentam limitações fotofísicas e estruturais que dificultam sua aplicação em TFD.^{9,12} Dessa forma, a exploração do potencial do HP na fototerapia antimicrobiana requer otimizações adicionais na formulação, no método de extração e em estudos aprofundados sobre sua dinâmica fotofísica.

Conclusão

Os achados deste estudo demonstram, de forma consistente, que o Azul de Metileno apresentou desempenho superior como fotossensibilizador na Terapia TFDA frente à cepa de *Escherichia coli* avaliada. Em ambas as concentrações testadas (0,05% e 0,1%), a associação do AM com a irradiação em 660 nm resultou em completa inativação bacteriana, evidenciando forte dependência da ativação luminosa para a geração eficiente de espécies reativas de oxigênio e consequente dano celular. Esses resultados confirmam o potencial robusto do Azul de Metileno como agente fotodinâmico para o controle de bactérias Gram-negativas.

Por outro lado, o extrato de *Hypericum perforatum* não apresentou atividade antimicrobiana significativa, independentemente da concentração utilizada ou da presença de luz. A ausência de fotoinativação sugere que, nas condições experimentais deste trabalho, o HP não atuou de forma eficaz como fotossensibilizador, possivelmente devido às limitações físico-químicas do extrato, à baixa penetração em estruturas bacterianas de Gram-negativas ou à inadequação do solvente para maximizar sua atividade biológica.

Em conjunto, os dados indicam que a TFDA com Azul de Metileno é uma estratégia promissora para inativar *E. coli* em meio planctônico, enquanto o *Hypericum perforatum* não demonstrou potencial aplicável neste

modelo experimental. Recomenda-se que estudos futuros avaliem diferentes métodos de extração do HP, ajustes de solvente, variações na concentração, bem como sua aplicação contra bactérias Gram-positivas, para elucidar melhor seu possível papel na terapia fotodinâmica. Além disso, investigações adicionais envolvendo tempos de irradiação, diferentes fontes luminosas e testes em biofilmes podem ampliar a compreensão sobre a eficácia e aplicabilidade da TFDA em cenários clínicos mais complexos.

Referências

1. Nordmann P. *Escherichia coli* as a cause of serious infections. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2010 [citado 2025 mar. 17];16(6):476–80. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0950268810000212>.
2. Guadalupe RA. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública de México. [Internet]. 2002 [citado 2025 mar. 20];44(5):464-475. Disponível em: <https://www.scielosp.org/pdf/spm/v44n5/14036.pdf>.
3. Mosquito S; Ruiz J; Bauer JL; Ochoa TJ. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. [Internet]. 2011 [citado 2025 mar. 25];28:648-656. Disponível em: https://www.scielosp.org/article/ssm/content/raw/?resource_ssm_path=/media/assets/rpmesp/v28n4/a13v28n4.pdf.
4. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? Photochem Photobiol Sci [Internet]. 2004 [citado 2025 abr. 02];3(5):436–50. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/B311900A>.
5. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mecanismos da terapia fotodinâmica: parte em fotossensibilizadores, fotoquímica e localização celular. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2004;1(4):279–93. doi: 10.1016/S1572-1000(05)00007-4.
6. Ragàs X, Ele X, Agut M, Roxo-Rosa M; Gonsalves AR, Serra AC, et al. Oxigênio singlete na terapia fotodinâmica antimicrobiana: produção e degradação dependentes de fotossensibilizador em *E. coli*. Molecules. 2013;18(3):2712-25. doi: 10.3390/molecules18032712.
7. Goulart RC. Uso da Terapia Fotodinâmica para a inativação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em meio planctônico e em biofilme [tese de doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009. [citado 2025 set. 27]. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-14062010-141236/publico/Rosangelal_Goulart.pdf.
8. Lima A, Gracetto A, Biondo CEG, Batistela V, Hioka N, Severino D, Oliveira HP, et al. Efeito do solvente sobre as propriedades espectroscópicas do azul de metileno. XI Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino-Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. [Internet]. 2007 [citado 2025 jun. 27]. Disponível em: https://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2007/trabalhos/exatas/inic/INICG00047_01C.pdf.
9. Saddiqe Z; Naeem I; Maimoona A. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. J Ethnopharmacol. 2010;131(3):511-21. doi: 1016/j.jep.2010.07.034.
10. Klemow Kenneth M, Bartlow Andrew, Crawford Justin, Kocher Neil, Shah Jay, Ritsick Michael. Atributos medicinais da erva-de-são-joão (*Hypericum perforatum*). In: Benzie IFF; Wachtel-Galor S, editores. Fitoterapia: Aspectos Biomoleculares e Clínicos. 2.ª ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011. Capítulo 11. [Internet]. 2011 [citado 2025 nov. 07]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92750/>.
11. Wu JJ, Zhang J, Xia CY, Ding K, Li XX, Pan XG et al. Hypericin: a natural anthraquinone as promising therapeutic agent. Phytomedicine. [Internet]. 2023 [citado 2025 set. 14];111:154654. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711323000144>.
12. Vollmer A, Al-Ahmad A, Argyropoulou A, Thurnheer T, Hellwig E, Attin T, et al. A fotoinativação antimicrobiana utilizando luz visível mais infravermelho (VIS + wIRA) e *Hypericum Perforatum* modifica biofilmes orais *in situ*. Relatório Científico: 30 de dezembro de 2019;9(1):20325. doi: 10.1038/s41598-019-56925-7.
13. Benov L. Terapia fotodinâmica: estado atual e perspectivas futuras. Princípios Médicos Praticantes. 2015;24 Supl.1 (Supl 1):14-28. doi: 10.1159/000362416.
14. Silva ER, Santos EP, Pereira E, Ricci Júnior E. Terapia fotodinâmica no tratamento do câncer de pele: conceitos, utilizações e limitações. Rev Bras Farm. 2009;90(3):211–7.
15. Lopes IMI. Estudos fotofísicos de Photodithazine® com variação de pH e formação de nanocompósitos para melhora de atividade antimicrobiana em terapia fotodinâmica. [tese de doutorado] – São Paulo: Escola de Artes Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo; 2023.

Endereço para correspondência:

Laura Junqueira Barbosa
Rua José Venâncio Nogueira, 353 – Vila Santos
Caçapava – SP, CEP 12280-660
Brasil

E-mail: lau.junqueirwab@gmail.com

Recebido em 24 de outubro de 2025
Aceito em 27 de novembro de 2025