



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS **SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2025**

Investigação histológica dos efeitos da fotoinativação de *Staphylococcus aureus* mediado por DMMB-AuNPs

Amanda Ines Vieira de Mello¹; Anildo Alves de Brito Júnior²; Juliana Monteiro Azevedo³

1. Amanda Ines Vieira de Mello, PIBIC/FAPESB, ODONTOLOGIA, e-mail: amandaines.mello@gmail.com

2. Anildo Alves de Brito Júnior, PPGOS, FOUFBA, e mail: junioranildo02@gmail.com

3. Juliana Monteiro Azevedo, DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, e-mail: jscmonteiro@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: Inativação Fotodinâmica, Nanotecnologia, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

A ruptura da continuidade normal das estruturas corporais leva à formação de uma ferida, e a reparação desse tecido constitui um processo biológico pelo qual o organismo tenta regenerar a área lesionada, restaurando sua estrutura e função. Contudo, a presença de bactérias patogênicas na ferida está relacionada à sua cronicidade, uma vez que a colonização bacteriana retarda o processo de cicatrização da pele e das membranas mucosas, como descrito por Rahim *et al.* (2017).

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) constitui uma abordagem terapêutica promissora no controle de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, caracterizando-se pela baixa probabilidade de induzir resistência microbiana. O mecanismo de ação baseia-se na utilização de um fotossensibilizador (FS), que, ao ser ativado pela absorção de luz em comprimento de onda específico, desencadeia a produção de espécies reativas de oxigênio altamente citotóxicas para as células-alvo, incluindo bactérias (Huang *et al.*, 2017).

O *Staphylococcus aureus* é o principal representante do grupo dos estafilococos, frequentemente associado a feridas infectadas. Sua presença interfere negativamente nos processos de remodelação e reparo tecidual, além de aumentar significativamente o risco de infecções sistêmicas graves, como relata Monteiro *et al.* (2020).

Assim, considerando que as infecções estafilocócicas representam um importante problema de saúde pública devido à elevada resistência desenvolvida por *Staphylococcus aureus* aos antibióticos convencionais, torna-se evidente a necessidade de investigar terapias alternativas com potencial inovador e eficaz. Portanto, partindo da hipótese de que a TFDa com DMMB-AuNPs, quando ativada por LED, poderia exercer efeito bactericida sobre *S. aureus* e influenciar positivamente o processo de reparo tecidual, o presente experimento teve como objetivo avaliar, por meio de análises histológicas, os efeitos da TFDa na cicatrização de feridas contaminadas em dorso de ratos, utilizando o

conjugado DMMB-AuNPs associado à luz LED vermelha (λ 630 $\pm$ 20 nm, 125 mW, 12 J/cm², 192 s).

MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo dessa pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Instituto de Ciências da Saúde) (CEUA/ICS.UFBA) sob o nº 7290250722. Foram utilizados 24 ratos da linhagem Wistar, machos, idade média de três meses, peso entre 250 e 300g alojados no laboratório de Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA).

Para realização das feridas cirúrgicas infectadas, os animais foram anestesiados, realizou-se a tricotomia do dorso do animal e antisepsia local com solução de clorexidina a 2%. A incisão cirúrgica foi realizada com bisturi com lâmina nº15 seguindo a demarcação e para confirmar a dimensão da ferida utilizou-se um paquímetro (Mitutoyo, São Paulo, Brasil).

A cepa bacteriana usada nesse experimento foi *S. aureus* ATCC 25923. Vinte e quatro horas após a inoculação de *S. aureus*, um swab foi coletado das secreções das feridas e semeadas em placas de petri com meio Baird-Parker para confirmar a contaminação. Após incubadas em uma estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas foi realizada a contagem das UFC. Quarenta e oito horas após a inoculação de *S. aureus*, após confirmação da infecção, os 24 animais contaminados foram organizados em quatro grupos experimentais (Controle, LED, DMMB-AuNPs e DMMB-AuNPs + LED) que receberam tratamentos específicos.

Para preparação do conjugado DMMB+AuNPs foi utilizado o corante 1,9 dimetil azul de metileno (DMMB) (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e as nanopartículas de ouro esféricas (AuNPs) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), conforme Monteiro (2020). O tempo de pré-irradiação, que corresponde ao período necessário para que a bactéria absorva o DMMB-AuNPs, foi de cinco minutos, Monteiro *et al.*, (2020). Para excitar o FS foi utilizado o LED vermelho, λ 630 $\pm$ 20nm, CW, potência de 125 $\pm$ 5 mW, densidade de energia 12J/cm² (Fisioled, MMOptics, São Carlos, SP) para cálculo em uma área média de incidência de 0,785cm² e tempo de 192 segundos.

Após os tratamentos experimentais, amostras foram semeadas em triplicata em placas de petri com meio Baird-Parker. Subsequentemente, foram incubadas em uma estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, uma análise microbiológica foi realizada através da contagem de unidades formadoras de colônia (CFU/mL), cálculo do log CFU/mL (Log10 CFU/mL) e organização dos dados para análise estatística utilizando o software GraphPad® Prism 8.1 (San Diego, CA, EUA). A análise foi feita com método ANOVA e o teste de Tukey, com significância estatística definida em $p < 0,05$ (Brito Júnior, *et al* 2025).

No sétimo dia, foi realizada a biópsia excisional da ferida com o auxílio de um bisturi e a eutanásia do animal por meio de sobredosagem anestésica. O espécime tecidual foi colocado em recipiente previamente identificado contendo solução fixadora de formalina a 10% e foram encaminhados ao Laboratório de Anatomopatologia da Faculdade de Odontologia da UFBA, para inclusão em blocos de parafina e corte em micrótomo. Depois as lâminas foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UNICAMP para realizar a coloração de Picrosírius, que se

associa especificamente às fibras colágenas, permitindo avaliar sua organização e maturidade, e onde foram realizadas as imagens de microscopia de luz polarizada. Todas as análises subsequentes foram realizadas por um observador cego ao tratamento, que avaliou descritivamente as características morfológicas (grau de reepitelização, formação de tecido de granulação e organização de colágeno).

RESULTADOS

Os resultados referentes à análise microbiológica foram recentemente divulgados por Brito Júnior et al. (2025) e demonstram que o efeito bactericida da terapia fotodinâmica foi verificado apenas na condição em que o conjugado DMMB-AuNPs foi ativado pela luz LED, evidenciando a eficácia antimicrobiana da TFDa frente ao *Staphylococcus aureus* com redução significativa da carga bacteriana em relação ao grupo Controle ($p < 0,0001$), correspondendo a uma diminuição de 99,999% — equivalente a uma redução de 5 log de CFU/mL.

A análise histológica comparativa evidenciou diferentes estágios do processo de reparo tecidual (Tabela 01).

Tabela 1: Avaliação histológica comparativa entre os grupos Controle, LED, DMMB-AuNPs e DMMB-AuNPs + LED.

Grupo	Reepitelização	Tecido granulação	Fibras colágenas
Controle	Nenhuma	Nenhuma	Desorganizadas, rarefeitas, predomínio de colágeno imaturo (III), baixa birrefringência
LED	Migrante, epitélio incompleto	Hipocelular, poucos vasos	Feixes mais densos, parcialmente organizados, mistura de colágeno III e I
DMMB-AuNPs	Hipertrófico, estrato córneo parcial	Muitas células, poucos vasos	Organização irregular, fragmentada, predomínio de colágeno III, birrefringência moderada
DMMB-AUNPs + LED	Completo, contínuo, estrato córneo íntegro	Mais fibras, poucas células	Colágeno maduro, espesso e organizado, predomínio de colágeno I, birrefringência intensa, remodelamento em curso

No grupo Controle, observa-se ausência de reepitelização, sem formação de tecido de granulação e com fibras colágenas desorganizadas, refletindo um processo de cicatrização interrompido. A intensidade da birrefringência parece reduzida em algumas áreas, o que pode refletir degradação enzimática do colágeno devido à ação bacteriana (*S. aureus*) e à resposta inflamatória. O grupo DMMB-AuNPS + LED apresentou um padrão mais maduro de cicatrização, com reepitelização completa, estrato córneo íntegro e contínuo, tecido de granulação menos celular, porém rico em fibras colágenas organizadas, indicando transição da fase proliferativa para remodelamento tecidual. Esses achados sugerem que a terapia fotodinâmica antimicrobiana (DMMB-AuNPS + LED) potencializou a resposta cicatricial, promovendo maior deposição de matriz extracelular e maturação do tecido quando comparada às demais intervenções.

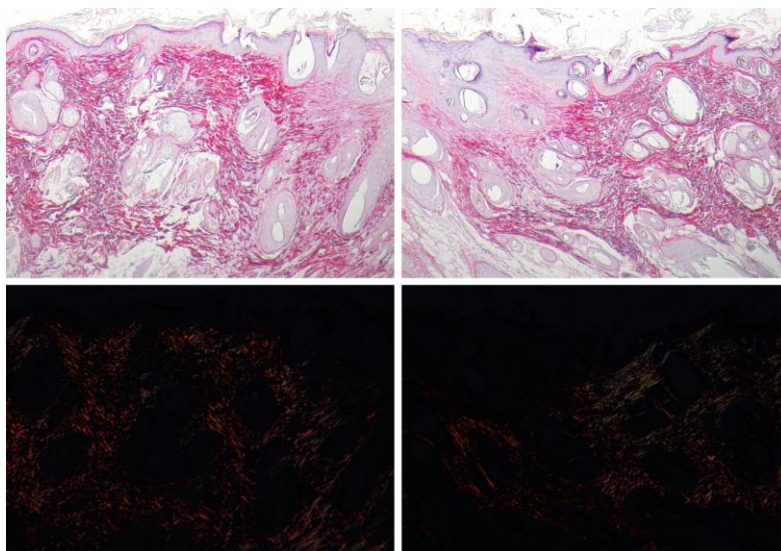


Figura 1: Coloração de Picrosirius do grupo DMMB-AuNPs + LED analisado em microscopia ótica sob luz branca e luz polarizada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os achados deste estudo evidenciam que a terapia fotodinâmica antimicrobiana com DMMB-AuNPs, ativada por LED, apresentou um efeito bactericida expressivo frente ao *S. aureus*, promovendo uma redução significativa da carga microbiana e impacto direto no processo de reparação tecidual em comparação aos demais grupos experimentais.

REFERÊNCIAS

- RAHIM, K.; SALEHA, S.; ZHU, X.; HUO, L.; BASIT, A.; FRANCO, O.L. 2017. Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. In: Microbial Ecology, v.73, n.3, p.710-721.
- HUANG, Liyi; XUAN, Yi; KOIDE, Yuichiro; ZHIYENTAYEV, Timur; TANAKA, Masamitsu; HAMBLIN, Michael R.. 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, [S.L.], v. 44, n. 6, p. 490-499, 3 jul. 2012. Wiley.
- MONTEIRO, J.S.C.; RANGEL, E.E.; DE OLIVEIRA, S.C.P.S.; CRUGEIRA, P.J.L.; NUNES, I.P.F.; DE A. FAGNANI, S.R.C.; SAMPAIO, F.J.P.; DE ALMEIDA, P.F.; PINHEIRO, A.L.B. 2020. Enhancement of photodynamic inactivation of planktonic cultures of *Staphylococcus aureus* by DMMB-AuNPs. In: Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v.31, p.101930.
- ALVES DE BRITO JÚNIOR, A.; LOURO CRUGEIRA, P.J.; REIS COSTA, W.L.; BARBOSA, A.V.; PIRES SAMPAIO DE OLIVEIRA, S.C.; TEIXEIRA CANGUSSU, M.C.; NUNES DOS SANTOS, J.; MONTEIRO AZEVEDO, J.; BARBOSA PINHEIRO, A.L. 2025. Antimicrobial photodynamic therapy using gold nanoparticles conjugated with 1,9-dimethyl-methylene blue for treating *Staphylococcus* skin infections. In: Lasers in Medical Science, v.40, n.1, p.103.