



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

Aplicação da terapia fotodinâmica mediada por Eritrosina contra *Escherichia coli* in vitro e matriz alimentar

VANESSA DE CARVALHO RODRIGUES

MARINGÁ

2024

VANESSA CARVALHO RODRIGUES

**“APLICAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR ERITROSINA
CONTRA *ESCHERICHIA COLI* EM TESTES IN VITRO E MATRIZ
ALIMENTAR”**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos.

Documento assinado digitalmente
 **ADRIELE RODRIGUES DOS SANTOS**
Data: 30/08/2024 14:01:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Adriele Rodrigues dos Santos

Documento assinado digitalmente
 **BENICIO ALVES DE ABREU FILHO**
Data: 03/09/2024 07:03:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Benicio Alves de Abreu Filho

Documento assinado digitalmente
 **JANE MARTHA GRATON MIKCHA**
Data: 04/09/2024 15:55:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Profa. Dra. Jane Martha Graton Mikcha
Orientadora**

Documento assinado digitalmente
 **PAULA ALINE ZANETTI CAMPANERUT SA**
Data: 04/09/2024 11:27:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá

Documento assinado digitalmente
 **KARINA MAYUMI SAKITA**
Data: 03/09/2024 09:19:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Karina Mayumi Sakita

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

R696a

Rodrigues, Vanessa Carvalho

Aplicação da terapia fotodinâmica mediada por Eritrosina contra *Escherichia coli in vitro* e matriz alimentar / Vanessa Carvalho Rodrigues. -- Maringá, PR, 2024.
40 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Jane Martha Graton Mikcha.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2024.

1. Terapia fotodinâmica (TFD). 2. Eritrosina. 3. *Escherichia coli*. I. Mikcha, Jane Martha Graton, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDD 23.ed. 664.028

Orientador
Profa. Dra. Jane Martha Graton Mikcha

BIOGRAFIA

Vanessa de Carvalho Rodrigues nasceu na cidade de Goioerê, Paraná. Possui graduação em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus Campo Mourão e mestrado em Tecnologia de Alimentos pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA) da UTFPR, campus Campo Mourão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre comigo. Foram muitas as vezes que o cansaço e os percalços me fizeram pensar em desistir, mas Ele me deu força e pessoas maravilhosas nesta caminhada que sempre me levantaram quando eu precisei.

À minha irmã, Heloísa, minha mãe, Mariluci, meu cunhado James. Cada obrigada que eu disser não será suficiente, sei que eu jamais teria conseguido sem o carinho e a paciência de vocês. Mas quem eu realmente preciso agradecer não sabe ler uma palavra do que tem aqui! Murilo, amor da tia, foi você que me fez tirar forças de onde eu nem imaginava ter. Muito obrigada, pequeno!

Agradeço imensamente à minha orientadora, professor Jane. Primeiro pela confiança, aceitando uma orientanda de outra cidade. Muitas reuniões e alguns puxões de orelha, sempre necessários, via meet. Mas preciso agradecer mesmo pela paciência que você sempre teve comigo. Foram muitas coisas realmente inesperadas que aconteceram nestes pouco mais de quatro anos, inclusive uma pandemia. Obrigada pela parceria. Agradeço também a minha amiga e co-orientadora informal, Adriele, que sempre esteve disposta a compartilhar comigo todo o conhecimento e ideias sobre este trabalho, além de aguentar meus momentos de desespero. Muito obrigada.

Agradeço à minha equipe de trabalho, Adriele, Kassia, Moacir e Marcelo, pela compreensão e suporte que foram fundamentais para que eu concluísse o doutorado.

Estendo meus agradecimentos aos demais professores, em especial ao Evandro Bona e Camila Fabiano de Freitas, que sempre estiveram à disposição para me atender e me auxiliaram em diversos momentos, sempre sanando minhas dúvidas com muita paciência e educação.

Agradeço o apoio fundamental daqueles que eu sei que sempre estarão comigo. Maria, João Guilherme, Danilo, Eliza, Maria Eduarda, Stefhahie e Anielle. Agradeço também às pessoas que passaram pela minha vida e que, de alguma forma, torceram para que tudo desse certo.

Aos membros da banca examinadora, pela atenção e contribuição no trabalho e todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, cada um de vocês foi fundamental para minha formação profissional e pessoal.

APRESENTAÇÃO

Essa tese de doutorado está apresentada na forma de dois artigos científicos experimentais.

O capítulo 1 apresenta o artigo intitulado “*Optimization of the Erythrosine-mediated photodynamic therapy against Escherichia coli using response surface methodology*”, de autoria de Vanessa Carvalho Rodrigues, Adriele Rodrigues dos Santos, Evandro Bona, Camila Fabiano Freitas, João Vitor de Oliveira Silva, Luis Carlos Malacarne, Miguel Machinski Junior, Benício Alves de Abreu Filho, Jane Martha Graton Mikcha, publicado na revista Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2023.103916>.

O capítulo 2 refere-se à segunda etapa experimental do trabalho, com o artigo denominado “*Aplicação da terapia fotodinâmica na inativação de Escherichia coli em suco industrializado*” de autoria de Vanessa Carvalho Rodrigues, João Guilherme Buzetto Tsuchiya, Adriele Rodrigues dos Santos, Evandro Bona, Camila Fabiano Freitas, Luis Carlos Malacarne, Miguel Machinski Junior, Benício Alves de Abreu Filho, Jane Martha Graton Mikcha.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	10
GENERAL ABSTRACT.....	11
CAPÍTULO 1: Aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta na Inativação de <i>Escherichia coli</i> utilizando Terapia Fotodinâmica Mediada por Eritrosina.....	12
RESUMO	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
2.1 Fotossensibilizador e fonte de luz.....	16
2.2. Culturas bacterianas e condições de crescimento.....	17
2.3. Terapia fotodinâmica.....	18
2.4. Otimização da atividade fotoinibitória da ERI utilizando a metodologia de superfície de resposta.....	18
3. RESULTADOS	10
3.1. Dose de luz	10
3.2. Terapia fotodinâmica.....	10
3.3. Análise estatística dos modelos	11
4. DISCUSSÃO.....	13
REFERÊNCIAS	18
MATERIAL SUPLEMENTAR	25
CAPÍTULO 2: Terapia fotodinâmica com Eritrosina na inativação de <i>Escherichia coli</i> em suco de morango industrializado	29
RESUMO	30
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.1 Delineamento experimental.....	32
2.2 Sistema de díodos emissores de luz (LED) e dose de luz.....	32
2.3 Terapia fotodinâmica	34
2.3.1 Controles.....	34
2.3.2 Aplicação da TFD em suco industrializado de morango.....	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4. CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS	39

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS – O capítulo 1 abordou a terapia fotodinâmica (TFD), que combina luz e fotossensibilizador (FS) para inativação de micro-organismos. O objetivo foi otimizar as condições experimentais de concentração de Eritrosina B (ERI) e tempo de iluminação utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) para a inativação de diferentes cepas de *Escherichia coli*. O capítulo 2 explorou a aplicação da TFD em alimentos, especificamente para a inativação de *E. coli* em suco industrializado de morango. O objetivo foi avaliar a eficácia da TFD mediada por ERI na redução da contaminação bacteriana em suco de morango industrializado.

MATERIAL E MÉTODOS – No capítulo 1, a Eritrosina B foi utilizada como fotossensibilizador em combinação com luz LED verde. O estudo envolveu o uso de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para otimizar a TFD em cepas de *E. coli*. As culturas bacterianas foram expostas à luz em diferentes concentrações de ERI e por diversos tempos, e a viabilidade bacteriana foi medida após o tratamento. No capítulo 2, foi utilizado um sistema de LED verde para aplicação de TFD no suco de morango contaminado com *E. coli*. As variáveis testadas incluíram diferentes doses de luz e concentrações de ERI. As contagens bacterianas foram realizadas após os tratamentos, e os resultados foram analisados estatisticamente.

PRINCIPAIS RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÕES – Capítulo 1: O DCCR permitiu prever condições ótimas de ERI e exposição à luz. Foi observado que o tempo de exposição à luz teve a maior influência na inativação das bactérias. Testes laboratoriais validaram as condições otimizadas e nenhuma célula viável foi recuperada com ERI a 116 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 30 min de luz (33,34 J cm^2) para *E. coli* ATCC 25922, 108 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 40 min (44,38 J cm^2) para *E. coli* ATCC 35218 e 108 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 29,3 min (32,5 J cm^2) para *E. coli* O157:H7 EDL 933. A MSR provou ser uma ferramenta eficaz para otimizar as condições da TFD, permitindo uma redução no número de experimentos necessários e melhorando a qualidade dos resultados. A técnica mostrou-se promissora para inativar *E. coli*. Capítulo 2: A TFD mediada por ERI foi eficaz na redução da população de *E. coli* no suco industrializado. A análise estatística confirmou que a metodologia aplicada foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade bacteriana sob as condições experimentais testadas. As condições ótimas de inativação podem ser observadas próximas à região do ponto central (5,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 6 minutos). Os resultados demonstram que a TFD pode ser uma técnica viável para a inativação de bactérias em sucos industrializados, oferecendo uma alternativa de métodos de conservação de alimentos. O estudo concluiu que a otimização das condições de luz e concentração de ERI foi fundamental para a eficácia da técnica.

Palavras-chave: Fotoinativação, xantenos, delineamento experimental, bactéria Gram-negativa

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION AND OBJECTIVES – Chapter 1 deals with photodynamic therapy (PDT), which combines light and photosensitizer (PS) to inactivate microorganisms. The aim was to optimize the experimental conditions of Erythrosin B (ERY) concentration and illumination time using Response Surface Methodology (RSM) to inactivate different *Escherichia coli* strains. Chapter 2 explored the application of PDT in food, specifically for the inactivation of *Escherichia coli* in industrialized juice. The aim was to evaluate the effectiveness of ERI-mediated PDT in reducing bacterial contamination in an industrialized strawberry juice.

MATERIAL AND METHODS – In Chapter 1, Erythrosin B was used as a photosensitizer with green LED light. The study used a Rotational Central Composite Design (RCCD) to optimize PDT in *E. coli* strains. Bacterial cultures were exposed to light at different ERY concentrations and for different times, and bacterial viability was measured after treatment. Chapter 2 used a green LED system to apply PDT to strawberry juice contaminated with *E. coli*. The variables tested included different light doses and ERY concentrations. Bacterial counts were taken after the treatments, and the results were statistically analyzed.

MAIN RESULTS, DISCUSSION AND CONCLUSIONS – Chapter 1: The RCCD made predicting optimum ERY and light exposure conditions possible. It was observed that the time of exposure to light had the greatest influence on the inactivation of the bacteria. Laboratory tests validated the optimized conditions and no viable cells were recovered with ERY at 116 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 30 min of light (33.34 J cm^{-2}) for *E. coli* ATCC 25922, 108 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 40 min (44.38 J cm^{-2}) for *E. coli* ATCC 35218 and 108 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 29.3 min (32.5 J cm^{-2}) for *E. coli* O157:H7 EDL 933. MSR proved to be an effective tool for optimizing PDT conditions, reducing the number of experiments required and improving the quality of the results. The technique showed promise for inactivating *E. coli*. Chapter 2: ERY-mediated PDT effectively reduced the *E. coli* population in industrialized juice. Statistical analysis confirmed that the methodology applied was able to reduce bacterial viability under the experimental conditions tested significantly. The optimum inactivation conditions can be observed close to the central point region (5.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 6 minutes). The results demonstrate that PDT can be a viable technique for inactivating bacteria in industrialized juices, offering an alternative method of food preservation. The study concluded that optimizing light conditions and ERY concentration was fundamental to effectiveness.

Keywords: Photoinactivation, xanthenes, experimental design, Gram-negative bacteria

CAPÍTULO 1: Aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta na Inativação de *Escherichia coli* utilizando Terapia Fotodinâmica Mediada por Eritrosina.

Vanessa de Carvalho Rodrigues^{*1}, Adriele Rodrigues dos Santos², Evandro Bona³, Camila Fabiano Freitas^{4,5}, João Vitor de Oliveira Silva⁶, Luana Carolina Martins Rosa¹, Luis Carlos Malacarne⁷, Jane Martha Graton Mikcha⁶.

¹Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

²Coordenação experimental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

³Departamento Acadêmico de Alimentos e Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

⁴Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

⁵Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

⁶Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

⁷Departamento de Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A eficácia da terapia fotodinâmica (TFD) depende da combinação de luz e fotossensibilizador para inativação de micro-organismos. Porém, encontrar as condições ideais para os fatores envolvidos nesta técnica é demorado e dispendioso. O desenho central composto rotacional (DCCR) é uma ferramenta que pode ser aliada à TFD para obter resultados precisos em um menor tempo de trabalho.

MÉTODOS: Este estudo utilizou a metodologia de superfície de resposta para otimizar os parâmetros da TFD mediada por Eritrosina (ERI) e diodos emissores de luz verde (LED) em diferentes cepas de *Escherichia coli* através da aplicação de DCCR.

RESULTADOS: O DCCR previu valores ótimos de ERI e exposição à luz na TFD. De acordo com os resultados experimentais, o tempo de exposição à luz apresentou influência mais significativa na inativação das bactérias avaliadas. As condições operacionais otimizadas foram validadas em testes de laboratório e nenhuma célula viável foi recuperada com ERI a $116 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 30 min de luz ($33,34 \text{ J cm}^{-2}$) para *E. coli* ATCC 25922, $108 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 40 min ($44,38 \text{ J cm}^{-2}$) para *E. coli* ATCC 35218 e $108 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 29,3 min ($32,5 \text{ J cm}^{-2}$) para *E. coli* O157:H7 EDL 933.

CONCLUSÃO: Os modelos polinomiais ajustados forneceram informações precisas sobre os efeitos combinados do ERI e do tempo de iluminação com LED verde no TFD. A aplicação do DCCR, além de reduzir o número de experimentos, também permite aumentar a quantidade e a qualidade dos resultados. Portanto, a metodologia de resposta de superfície combinada com TFD é uma abordagem promissora para inativar *E. coli*.

Palavras-chave: Fotoinativação; Xantenos; Bactéria Gram-negativa; *Design* experimental; Terapia fotodinâmica.

1. INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica que combina um fotossensibilizador (FS), luz visível e oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) para gerar espécies reativas de oxigênio (ERO). Esta técnica promove a inativação de micro-organismos através de danos irreversíveis a vários componentes biológicos da célula bacteriana [1]. O processo de TFD é caracterizado por alta seletividade, baixos custos e rápida morte microbiana; permite aplicações repetitivas [2], uma vez que não promove resistência bacteriana. Um dos campos de aplicação da TFD é o controle de micro-organismos em produtos alimentares [3–5]. Além disso, também é estudada para aplicações terapêuticas em infecções bacterianas e fúngicas [6–11], câncer [12–15], antivirais [16,17] e na área odontológica [18–21].

A Eritrosina B (ERI) ou 2,4,5,7 tetraiodofluoresceína, também conhecida como corante vermelho ácido 51 (Color Index, CI 45430), destaca-se entre os FSs utilizados pois é aprovada para uso alimentício e comumente usada em doces, picolés e géis decorativos para bolos, sempre que se desejam as cores rosa ou vermelho [22]. A ingestão diária aceitável para ERI recomendada pelo Comitê Conjunto de Especialistas em Aditivos Alimentares da FAO/OMS (JECFA), é de 0,1 mg/kg de peso corporal (pc) por dia [23]. Este corante tem sido testado com sucesso no controle de micro-organismos [24,25]. Seu uso na TFD pode ser atribuído à sua alta absorptividade molar ($\lambda_{\text{max}} = 517 \text{ nm}$; $\epsilon = 96,6 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [26] e à elevada geração de oxigênio singlete ($\phi\Delta^1\text{O}_2 = 0,63$) [27].

Estudos avaliaram a eficiência da TFD e da ERI como fotossensibilizador [28–31]. No entanto, os dados relacionados à concentração e à luz utilizada mostraram uma grande variação. Esse fator pode resultar em muitos testes para obter a concentração ideal de FS e tempo de exposição à luz necessários para alcançar a inibição microbiana total. Portanto, determinar as condições experimentais adequadas para a concentração do FS e o tempo de iluminação, apesar de parecer simples, exige a realização de um número significativo de experimentos. Além disso, mesmo com uma extensa série de experimentos, as condições ótimas podem não ser alcançadas.

Nesse sentido, a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), uma ferramenta que pode ajudar a identificar as condições ideais, pode ser uma aliada da TFD, otimizando testes e reduzindo significativamente o número de experimentos, o tempo de análise e os custos [32,33]. O delineamento composto central rotacional (DCCR) é comumente utilizado na técnica de delineamento experimental na MSR para ajustar um modelo quadrático utilizando o método dos mínimos quadrados [34]. Este método avalia todas as variáveis do estudo

simultaneamente e oferece modelos estatísticos que facilitam a compreensão das interações entre os parâmetros otimizados [34–36]. Portanto, este estudo teve como objetivo otimizar as condições de concentração de ERI e tempo de iluminação na fotoinativação de *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 e *E. coli* O157 EDL 933 utilizando a metodologia de superfície de resposta.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Fotossensibilizador e fonte de luz

Uma solução estoque de ERI (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemanha) foi preparada a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH: 7,2), padronizada em um espectrofotômetro (UV-Vis Beckman Coulter DU*800) e mantida no escuro a 4°C .

O protótipo do sistema de iluminação foi composto por uma matriz de 20 LEDs verdes de 3W de potência. Os sistemas de LED foram projetados opticamente e mecanicamente (paredes internas espelhadas) para obter uma área de irradiação homogênea ($> 90\%$) para a irradiação de culturas celulares usando microplacas de 24 poços. Um controlador automatizado permitiu o ajuste da irradiância (mW cm^{-2}) e da fluência (J cm^{-2}) controlando a corrente (regulador PWM) no sistema de LED e o tempo de iluminação. A irradiância espectral da câmara de LED foi obtida usando um radiômetro (Gooch & Housego, OL 756) acoplado a uma fibra óptica (Gooch & Housego, OL 730 7q-1.0) e uma esfera integradora de 50,8 mm de diâmetro (Gooch & Housego, IS-270) para fornecer uma densidade de potência. O sistema de LED verde *in vitro* utilizado nestes experimentos tinha a irradiância espectral descrita na Fig. 1. O espectro de emissão do LED apresentava um pico em 517 nm e uma largura de banda de 36 nm. A irradiância total foi dada pela área da curva (integração da irradiância espectral).

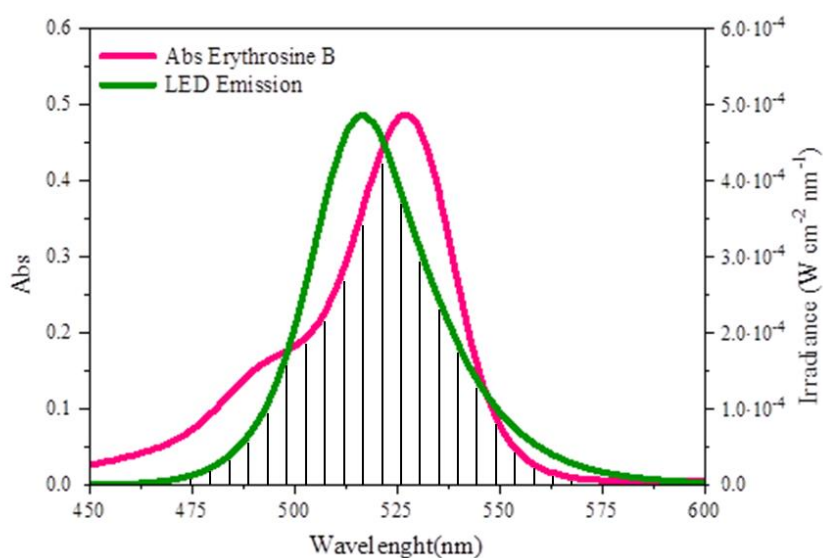


Fig. 1. Espectros de luz emitida pelo diodo emissor de luz (LED) (IEmitida) e irradiância espectral absorvida pela Eritrosina B (ERI) em diferentes concentrações (IAbs).

Para determinar as doses de luz (DAbs) para diferentes concentrações de ERI e tempos de iluminação, seguiu-se a metodologia descrita por Rabello et al. [37]. Primeiramente, a fração de luz absorvida (XAbs) pela ERI foi determinada usando a Equação 1, onde Abs representa a absorbância da ERI na concentração avaliada.

$$X_{Abs} = 1 - 10^{-Abs} \quad (1)$$

Subsequentemente, a irradiância absorvida pela ERI (IAbs; [W cm⁻²]) em cada uma das concentrações avaliadas foi determinada (Equação 2), considerando a irradiância total emitida pela luz (I0).

$$I_{Abs} = \int_{\lambda_i}^{\lambda_f} I_0(\lambda) X_{Abs}(\lambda) d\lambda \quad (2)$$

onde λ_i e λ_f são, respectivamente, os comprimentos de onda inicial e final do espectro de emissão do LED (nm), I_0 é a irradiância espectral do LED (W cm⁻² nm⁻¹), e XAbs é a fração de luz absorvida pelo FS, calculada de acordo com a Equação 1.

Finalmente, as doses de luz absorvida (DAbs) foram determinadas utilizando a Equação 3, com base na irradiância absorvida (IAbs) e no tempo de iluminação.

$$D_{Abs} = I_{Abs} \cdot t \quad (3)$$

2.2. Culturas bacterianas e condições de crescimento

Foram utilizadas neste estudo *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 (produtora de β -lactamase) e *E. coli* O157 EDL 933 (*E. coli* entero-hemorrágica), armazenadas a -20 °C em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Difco™) contendo 20% de glicerol. As bactérias foram incubadas durante a noite em BHI a 37°C. As células foram centrifugadas (4500 x g/5 min), lavadas três vezes, ressuspensas em PBS e padronizadas em um espectrofotômetro para 10⁷ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC mL⁻¹) para uso nos ensaios [38].

2.3. Terapia fotodinâmica

Um delineamento composto central rotacional, gerado pelo *software* MATLAB R2021b, foi utilizado para estabelecer as condições para a TFD mediada por ERI contra cepas de *E. coli* (Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3). As concentrações do FS e os tempos de iluminação utilizados no delineamento experimental estatístico foram predeterminados em estudos preliminares (dados não mostrados).

Os experimentos foram realizados de acordo com Silva et al. [38]. Em uma placa de 24 poços, solução de ERI e suspensão bacteriana foram adicionadas nas concentrações finais disponíveis, incubadas no escuro por 10 minutos, expostas à luz LED verde por até 30 minutos, diluídas em solução salina a 0,85% e plaqueadas em triplicata em Ágar Müller Hinton (MHA, HiMedia). As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C, e os resultados foram expressos em Log UFC mL⁻¹.

2.4. Otimização da atividade fotoinibitória da ERI utilizando a metodologia de superfície de resposta

Três DCCR foram realizados com um intervalo de tempo fixo, variando apenas os intervalos das concentrações de ERI de acordo com a bactéria avaliada. A matriz experimental está apresentada na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3. Um modelo quadrático foi ajustado aos dados experimentais (Equação (4)):

$$\log CFU = b_0 + b_1x_1 + b_{11}x_1^2 + b_2x_2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (4)$$

Na Equação 4, log UFC é a resposta prevista, b_0 é a interseção, b_1 e b_2 são os coeficientes de regressão para o efeito linear, b_{11} e b_{22} são os termos dos coeficientes quadráticos, b_{12} é o coeficiente de interação, x_1 representa o tempo de iluminação e x_2 a concentração de ERI.

A significância do modelo foi determinada por ANOVA ($p < 0,05$). O coeficiente de determinação (R^2), o coeficiente de determinação ajustado (R^2_{adj}), o erro quadrático médio (EQM) e a falta de ajuste foram utilizados para avaliar o desempenho da predição do modelo. O *software* MATLAB R2022a foi utilizado para a análise estatística dos dados. O algoritmo simplex sequencial foi aplicado para otimizar as condições experimentais que resultaram na inibição total das bactérias.

Tabela 1: Delineamento experimental (valores codificados e reais) utilizado para determinar a influência combinada de duas variáveis independentes (concentração de eritrosina e tempo de irradiação) na viabilidade de *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* ATCC 35218.

Experimentos	Valores codificados		Valores Reais				<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 35218
	x ₁	x ₂	Tempo (min.)	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Irradiância absorvida (mWcm^{-2})	Dose de luz (J cm^{-2})	Viabilidade celular (Log UFC mL^{-1})	Viabilidade celular (Log UFC mL^{-1})
Controle	-	-	30	0	0	-	$7,08 \pm 0,11$	$7,01 \pm 0,05$
1	-1	-1	8,66	50,50	18,29	9,50	$6,90 \pm 0,14$	$6,38 \pm 0,06$
2	-1	1	8,66	149,50	18,78	9,76	$6,97 \pm 0,04$	$6,94 \pm 0,00$
3	1	-1	26,34	50,50	18,29	28,91	$4,63 \pm 0,07$	$3,24 \pm 0,05$
4	1	1	26,34	149,50	18,78	29,68	$0,81 \pm 0,70$	$3,37 \pm 0,05$
5	-1,41421	0	5	100	18,65	5,60	$7,13 \pm 0,08$	$7,05 \pm 0,05$
6	1,41421	0	30	100	18,65	33,57	$0,51 \pm 0,88$	$2,89 \pm 0,03$
7	0	-1,41421	17,50	30	17,36	18,23	$6,93 \pm 0,05$	$6,30 \pm 0,15$
8	0	1,41421	17,50	170	18,82	19,76	$5,53 \pm 0,16$	$5,28 \pm 0,10$
9	0	0	17,50	100	18,65	19,58	$5,58 \pm 0,09$	$5,39 \pm 0,17$
10	0	0	17,50	100	18,65	19,58	$5,09 \pm 0,03$	$5,37 \pm 0,16$
11	0	0	17,50	100	18,65	19,58	$5,03 \pm 0,22$	$5,33 \pm 0,50$

Tabela 2: Delineamento experimental (valores codificados e reais) considerando uma maior faixa de avaliação da variável independente x_1 (concentração de eritrosina) na viabilidade de *E. coli* ATCC 35218.

Experimentos	Valores codificados			Valores Reais			<i>E. coli</i> ATCC 35218
	x_1	x_2	Tempo (min.)	Concentração	Irradiância absorvida	Dose de luz	Viabilidade celular
				($\mu\text{mol L}^{-1}$)	(mWcm^{-2})	(J cm^{-2})	(Log UFC mL^{-1})
Controle	-	-	30	0	0	-	$7,07 \pm 0,10$
1	-1	-1	8,66	69,54	18,29	9,50	$6,65 \pm 0,13$
2	-1	1	8,66	260,46	18,78	9,76	$7,12 \pm 0,06$
3	1	-1	26,34	69,54	18,29	28,91	$4,10 \pm 0,05$
4	1	1	26,34	260,46	18,78	29,68	$6,34 \pm 0,04$
5	-1,41421	0	5	165	18,65	5,60	$7,10 \pm 0,02$
6	1,41421	0	30	165	18,65	33,57	$3,72 \pm 0,11$
7	0	-1,41421	17,50	30	17,36	18,23	$5,99 \pm 0,16$
8	0	1,41421	17,50	300	18,82	19,76	$7,07 \pm 0,07$
9	0	0	17,50	165	18,65	19,58	$6,51 \pm 0,05$
10	0	0	17,50	165	18,65	19,58	$6,63 \pm 0,07$
11	0	0	17,50	165	18,65	19,58	$6,51 \pm 0,05$

Tabela 3: Delineamento experimental (valores codificados e reais) utilizado para determinar a influência combinada de duas variáveis independentes (concentração de eritrosina e tempo de irradiação) na viabilidade de *E. coli* O157:H7 EDL 93.

Experimentos	Valores codificados			Valores Reais			<i>E. coli</i> O157:H7 EDL 93
	x ₁	x ₂	Tempo (min.)	Concentração	Irradiância absorvida	Dose de luz	Viabilidade celular
				($\mu\text{mol L}^{-1}$)	(mWcm^{-2})	(J cm^{-2})	(Log UFC mL^{-1})
Controle	-	-	30	0	0	-	7,09 ± 0,10
1	-1	-1	8,66	18,43	16,12	8,37	7,04 ± 0,04
2	-1	1	8,66	102,57	18,49	9,61	6,98 ± 0,04
3	1	-1	26,34	18,43	16,12	25,48	4,26 ± 0,24
4	1	1	26,34	102,57	18,49	29,22	0,00* ± 0,00
5	-1,41421	0	5	60,50	18,22	5,47	7,00 ± 0,02
6	1,41421	0	30	60,50	18,22	32,80	0,00* ± 0,00
7	0	-1,41421	17,50	1	0,26	0,27	7,01 ± 0,02
8	0	1,41421	17,50	120	18,55	19,48	5,36 ± 0,22
9	0	0	17,50	60,50	18,22	19,13	2,65 ± 0,15
10	0	0	17,50	60,50	18,22	19,13	2,05 ± 0,13
11	0	0	17,50	60,50	18,22	19,13	2,06 ± 0,31

* Nenhum crescimento bacteriano dentro do limite de detecção da técnica

3. RESULTADOS

3.1. Dose de luz

O espectro de emissão do LED (com pico em 517 nm e largura de banda de 36 nm) mostrou excelente sobreposição com o espectro de absorção eletrônica da ERI em sua forma aniônica, conforme representado na Figura 1. O espectro de irradiância absorvida (IAbs) para todas as concentrações de ERI é apresentado na Figura 2. Os valores de IAbs e as doses de luz absorvida (DAbs) são apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3. Geralmente, o IAbs calculado não variou significativamente entre as diferentes concentrações, exceto para concentrações muito baixas ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Figura 2). Conforme mostrado na Equação 3, as doses de luz dependem da irradiância emitida/absorvida, do tempo de iluminação e da concentração do FS.

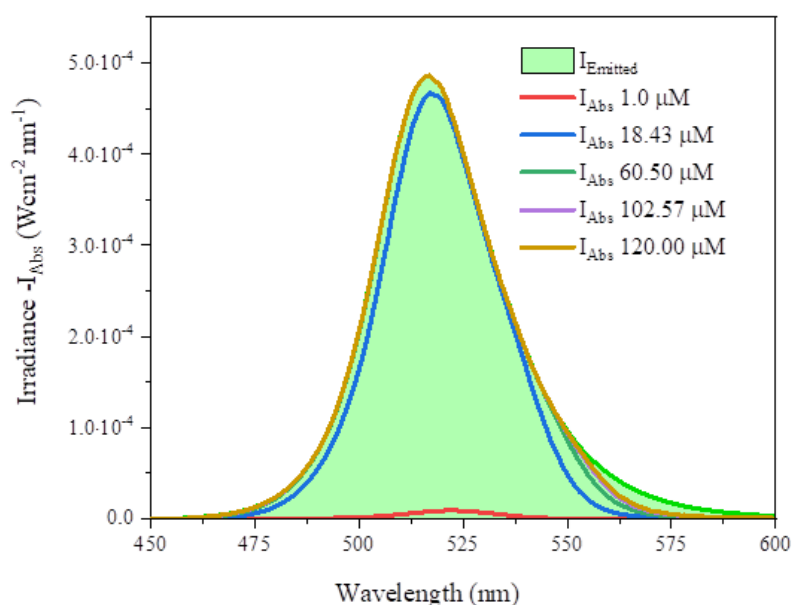


Fig. 2. Diodo emissor de luz (LED), irradiância emitida (IEmitada) e espectros eletrônicos de absorção da Eritrosina B (ERI).

3.2. Terapia fotodinâmica

A faixa de concentração do FS escolhida no primeiro modelo para *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* ATCC 35218 foi de 30 a $170 \mu\text{mol L}^{-1}$. Um segundo modelo, avaliando uma faixa mais ampla de concentrações de ERI (30 a $300 \mu\text{mol L}^{-1}$), foi calculado apenas para analisar *E. coli* ATCC 35218. Para *E. coli* O157 EDL 93, as concentrações de ERI foram de 1 a $120 \mu\text{mol L}^{-1}$. Tempos de iluminação de 5 a 30 minutos foram utilizados para todos os

modelos. Os dados estabelecidos pelo delineamento estatístico estão apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3.

As amostras utilizadas como controles de luz e escuro não mostraram redução na população bacteriana em comparação com o controle positivo (dados não mostrados). As maiores reduções para *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* ATCC 35218 foram observadas no Experimento 6 (6,57 e 4,12 Log UFC mL⁻¹) (Tabela 1). No segundo delineamento, a redução máxima nas contagens de *E. coli* ATCC 35218 foi de 3,36 Log UFC mL⁻¹, em uma concentração de ERI de 165 µmol L⁻¹ e 30 minutos de iluminação (Experimento 6) (Tabela 2). Para *E. coli* O157 EDL 93, não houve crescimento bacteriano nos Experimentos 4 (102,57 µmol L⁻¹ e 26,34 min) e 6 (60,50 µmol L⁻¹ e 30 min) (Tabela 3).

A partir dos resultados propostos pelo modelo, a otimização foi realizada aplicando o algoritmo simplex sequencial (23) para localizar as condições experimentais que resultaram em log UFC = 0. Os parâmetros obtidos foram 116 µmol L⁻¹ de ERI e 30 minutos de luz verde para *E. coli* ATCC 25922, 108 µmol L⁻¹ e 40 minutos para *E. coli* ATCC 35218, e 108 µmol L⁻¹ e 29,3 minutos para *E. coli* O157 EDL 933. As condições estabelecidas foram validadas em laboratório, onde foi possível alcançar a inibição total das cepas em estudo.

3.3. Análise estatística dos modelos

Para *E. coli* ATCC 25922, o primeiro delineamento proposto foi válido para fazer previsões. Nesse caso, todos os coeficientes foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) (Equação (5)). O modelo foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$) e não apresentou falta de ajuste ($p = 0,3366$), com $R^2 = 0,9861$, $R^2_{aj} = 0,9721$ e EQM = 0,3888.

$$\log UFC = 5,23 - 2,22x_1 - 0,75x_1^2 - 0,72x_2 + 0,45x_2^2 - 0,97x_1x_2 \quad (5)$$

Para *E. coli* ATCC 35218, os coeficientes b_2 , b_{22} e b_{12} (relacionados à variável concentração do FS) não foram significativos ($p > 0,05$) e foram removidos do delineamento. Após a exclusão, o coeficiente b_{11} teve seu valor alterado para -0,33 e teve um valor de $p = 0,06$ (nível de significância de 10%). Esse coeficiente foi mantido para preservar a qualidade do ajuste (Equação (6)).

$$\log UFC = 5,47 - 1,58x_1 - 0,33x_1^2 \quad (6)$$

Os valores experimentais de viabilidade celular foram próximos aos valores previstos pelo delineamento (Tabela 5), resultando em resíduos abaixo de 0,5 log UFC mL⁻¹, exceto para o Experimento 7. Os modelos foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) e não apresentaram falta de ajuste ($p = 0,4749$), com $R^2 = 0,9465$, $R^2_{aj} = 0,9331$ e EQM = 0,3807.

Considerando que a faixa de concentração do FS utilizada neste modelo para *E. coli* ATCC 35218 não foi significativa e que o objetivo era otimizar o resultado, um segundo delineamento foi proposto, variando a concentração de ERI de 30 a 300 µmol L⁻¹, mantendo o intervalo de tempo de 5 a 30 minutos (Tabela 2). Todos os coeficientes foram significativos ($p < 0,05$), exceto o coeficiente b_{22} , que foi removido (Tabela 4). A Equação (7) é a seguinte:

$$\log UFC = 6,55 - 1,01x_1 - 0,55x_1^2 + 0,53x_2 + 0,44x_1x_2 \quad (7)$$

O modelo apresentou resíduos abaixo de 0,4 log UFC (Tabela 5), $R^2 = 0,9659$, $R^2_{aj} = 0,9431$ e EQM de 0,2781, sendo estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Apesar de apresentar falta de ajuste (Tabela 6), o modelo pode ser considerado válido para fazer previsões, considerando o valor de R^2_{aj} e o baixo valor de EQM.

Para o delineamento realizado para *E. coli* O157 EDL 93, todos os coeficientes foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) (Tabela 4); a Equação (8) é a seguinte:

$$\log UFC = 2,26 - 2,46x_1 + 0,55x_1^2 - 0,83x_2 + 1,90x_2^2 - 1,05x_1x_2 \quad (8)$$

Os resíduos obtidos foram abaixo de 0,5 log UFC (Tabela 5). O modelo foi estatisticamente significativo e não apresentou falta de ajuste. Foram observados $R^2 = 0,9889$, $R^2_{aj} = 0,9777$ e EQM de 0,4207, indicando que o modelo apresentou uma excelente capacidade preditiva.

Os valores observados apresentados na Tabela 5 são os dados de resposta medidos no experimento de acordo com as condições propostas no delineamento experimental, e os valores previstos foram calculados a partir do modelo. Considerando que o limite de detecção da técnica é de 2 log UFC mL⁻¹, esses resíduos são baixos. O valor de R^2_{aj} representa a capacidade preditiva dos modelos ajustados, indicando que 97,21% (*E. coli* ATCC 25922), 93,31% (*E. coli* ATCC 35218) e 97,77% (*E. coli* O157 EDL 93) da variação total podem ser explicados pelos modelos.

Tabela 4. Coeficientes de regressão do modelo matemático da predição do efeito fotoinibitório no delineamento experimental.

Coeficiente	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>E. coli</i> ATCC 35218				<i>E. coli</i> O157:H7 EDL 93	
			Primeiro delineamento experimental		Segundo delineamento experimental			
	Coeficiente de regressão	<i>p</i> -valor	Coeficiente de regressão	<i>p</i> -valor	Coeficiente de regressão	<i>p</i> -valor	Coeficiente de regressão	<i>p</i> -valor
b_0	5,23	<0,0001	5,36	<0,0001	6,55	<0,0001	2,26	0,0002
b_1	-2,22	<0,0001	-1,58	0,0002	-1,01	0,0002	-2,46	<0,0001
b_{11}	-0,75	0,0058	-0,30	0,1705	-0,55	0,0077	0,55	0,0260
b_2	-0,72	0,0034	-0,09	0,5749	0,53	0,0044	-0,83	0,0025
b_{22}	0,45	0,0407	0,11	0,5669	0,01	0,9344	1,90	0,0001
b_{12}	-0,97	0,0041	-0,11	0,6390	0,44	0,0334	-1,05	0,0041

Tabela 5: Valores previstos, observados e residuais para os dados apresentados no delineamento experimental.

Experimento	<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>E. coli</i> ATCC 35218						<i>E. coli</i> O157:H7 EDL 93		
	Observado	Previsto	Resíduo	Primeiro delineamento experimental			Segundo delineamento experimental			Observado	Previsto	Resíduo
				Observado	Previsto	Resíduo	Observado	Previsto	Resíduo			
1	6,90	6,89	-0,01	6,38	6,72	0,34	6,65	6,93	0,28	7,04	6,95	-0,09
2	6,97	7,41	0,44	6,94	6,72	-0,22	7,12	7,11	-0,01	6,98	7,38	0,40
3	4,63	4,39	-0,24	3,24	3,57	0,33	4,10	4,02	-0,08	4,26	4,13	-0,13
4	0,81	1,01	0,20	3,37	3,57	0,20	6,34	5,97	-0,37	0,00	0,37	0,37
5	7,13	6,87	-0,26	7,05	7,04	-0,01	7,10	6,89	-0,21	7,00	6,84	-0,16
6	0,51	0,58	0,07	2,89	2,58	-0,31	3,72	4,02	0,30	0,00	-0,11	-0,11
7	6,93	7,14	0,22	6,30	5,47	-0,83	5,99	5,81	-0,18	7,01	7,23	0,22
8	5,53	5,12	-0,41	5,28	5,47	0,19	7,07	7,31	0,24	5,36	4,88	-0,48
9	5,58	5,23	-0,35	5,39	5,47	0,08	6,51	6,56	0,05	2,65	2,26	-0,39
10	5,09	5,23	0,14	5,37	5,47	0,10	6,63	6,56	-0,07	2,05	2,26	0,21
11	5,03	5,23	0,20	5,33	5,47	0,14	6,51	6,56	0,05	2,06	2,26	0,20

Tabela 6. Tabela ANOVA para verificar a adequação geral do segundo modelo proposto para *E. coli* ATCC 35218.

FV	SQ	GL	MQ	F_{calc}	p-valor
Regressão	13,1352	4	3,2838	42,4462	1,5499 x 10 ⁻⁴
Resíduo	0,4642	6	0,0774		
Falta de Ajuste	0,4540	4	0,1135	22,1873	0,0436
Erro puro	0,0102	2	0,0051		
Total	13,5994	10			

Para *E. coli* ATCC 35218, os coeficientes b_2 , b_{22} e b_{12} (relacionados à variável concentração do FS) não foram significativos ($p > 0,05$) e foram removidos do delineamento. Após a exclusão, o coeficiente b_{11} teve seu valor alterado para -0,33 e teve um valor de $p = 0,06$ (nível de significância de 10%). Esse coeficiente foi mantido para preservar a qualidade do ajuste (Equação (6)).

Considerando o R^2_{aj} , o EQM, o valor de p da regressão, o teste de falta de ajuste desses modelos e a variabilidade natural relacionada à experimentação microbiológica [39], os modelos podem ser considerados válidos para fazer previsões.

4. DISCUSSÃO

A inativação antimicrobiana fotodinâmica é uma estratégia emergente para o controle de bactérias patogênicas transmitidas por alimentos [3,25,40–48]. Técnicas alternativas para o controle de micro-organismos utilizando ERI podem ser úteis na indústria alimentícia, uma vez que este composto é aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) [49]. A seleção da ERI como modelo de FS baseia-se em estudos anteriores que determinaram seu potencial para inibir bactérias como *E. coli* (material de referência). Além disso, a aprovação da ERI para uso alimentício permite sua aplicação em bebidas e outros alimentos, desde que a cor rosa/vermelha seja destacada. Apesar das vantagens, os estudos relatados na literatura divergem entre si tanto na concentração quanto na quantidade de luz utilizada. Nesse caso, um número extenso de experimentos é necessário para determinar as melhores condições, que em muitos casos são longos o suficiente para serem considerados as condições ideais. Assim, o DCCR é uma estratégia promissora para determinar as condições experimentais ideais para aplicações de TFD. Associado a isso, outro problema constante em estudos envolvendo TFD está relacionado à falta de padronização na representação da dose de luz. Alguns trabalhos simplesmente informam a potência da fonte, sem atenção à sobreposição espectral e à dose de luz absorvida. Com isso em mente, o presente estudo traz a aplicação do DCCR no planejamento experimental das doses reais de luz absorvida pela ERI em cada concentração.

Os intervalos utilizados para os pontos experimentais foram escolhidos com base em estudos preliminares (dados não apresentados). O DCCR avaliou várias combinações possíveis de concentração de ERI e tempo de exposição à luz, com a adição de pontos centrais. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente para descrever a relação

entre a ERI, o tempo de iluminação e a viabilidade celular. Com base nos dados avaliados, o delineamento experimental identificou as condições com os melhores resultados para TFD mediado por ERI e *E. coli*. Até onde sabemos, não há relatos de uso de um delineamento matemático para otimizar os resultados do TFD mediado por ERI.

Este estudo demonstra os efeitos do TFD mediado por ERI contra *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 e *E. coli* O157 EDL 933 irradiadas com luz LED verde, aplicando um DCCR. Observou-se um efeito notável na redução da viabilidade celular nas cepas estudadas, comprovando a eficácia da técnica contra esses micro-organismos.

Para *E. coli* ATCC 25922, os termos lineares de tempo e concentração de ERI (b_1 e b_2) (Tabela 2) foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) e com valores negativos, indicando que quanto maior o tempo de iluminação e a concentração de ERI utilizados, menor a viabilidade celular. Este resultado do delineamento experimental é muito importante, pois nos permite definir o limite de concentração que deve ser usado na TFD. Assim, é possível trabalhar com segurança em uma concentração mais baixa de FS sem prejudicar o processo de inibição do micro-organismo. Os termos quadráticos (b_{11} e b_{22}) também foram significativos ($p < 0,05$), representando uma curvatura no gráfico de superfície de resposta (Fig. 3). Embora todos os coeficientes tenham sido estatisticamente significativos ($p < 0,05$), o valor de b_1 foi consideravelmente maior quando comparado às outras variáveis, indicando que o tempo de iluminação tem uma influência mais significativa na inativação de *E. coli* ATCC 25922.

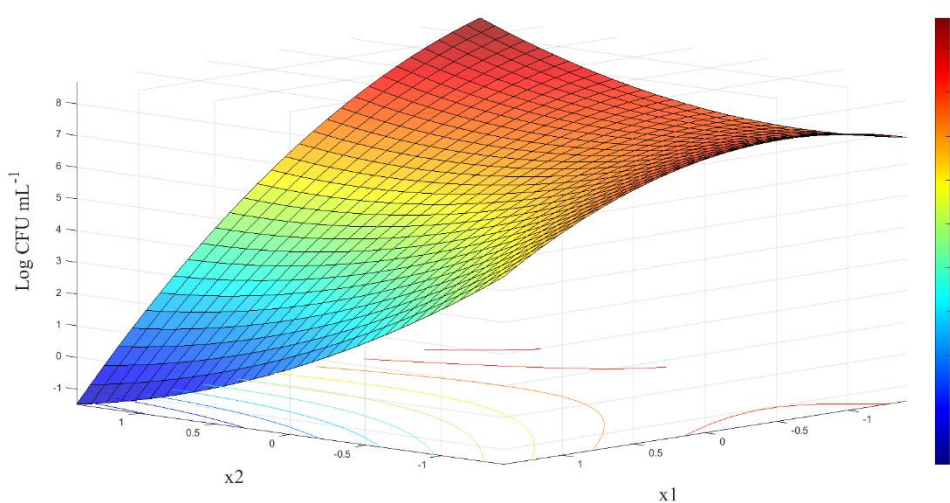


Fig. 3. Superfície de resposta para contagem de células viáveis em função de x_1 (tempo de exposição) e x_2 (concentração) para *E. coli* ATCC 25922.

O primeiro modelo mostrou uma excelente capacidade preditiva para *E. coli* ATCC 35218. No entanto, a faixa de concentração do FS avaliada não foi significativa, com a viabilidade celular sendo semelhante entre as concentrações mais baixas e mais altas (Tabela 1). Posteriormente, um novo delineamento (segundo modelo) foi realizado com uma maior faixa de concentrações de FS (30–300 $\mu\text{mol L}^{-1}$) para verificar se essa variável influenciava a inativação bacteriana em uma faixa de concentração diferente.

Neste segundo modelo, os termos lineares de tempo e concentração de ERI (b_1 e b_2) (Tabela 4) foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$), com um valor estimado negativo para b_1 . Esse resultado indica que quanto maior o tempo de iluminação, menor foi a viabilidade celular bacteriana. Os termos b_{11} e b_{12} também foram significativos ($p < 0,05$). O termo b_2 teve um valor estimado positivo, indicando que quanto maior a concentração de FS, menor foi a inativação de *E. coli* ATCC 35218 (Fig. 4).

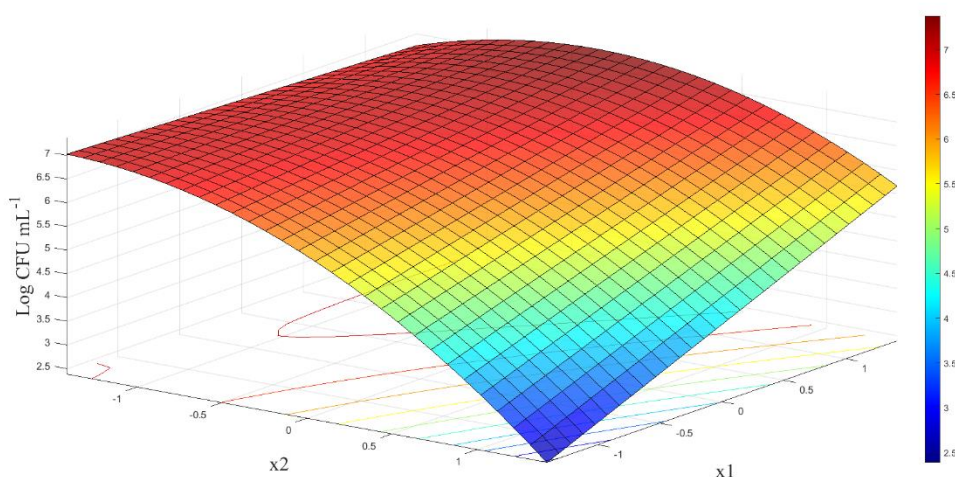


Fig. 4. Superfície de resposta para contagem de células viáveis em função de x_1 (tempo de exposição) e x_2 (concentração) para *E. coli* ATCC 35218.

Com base nos resultados, foi possível observar que o aumento excessivo da concentração de ERI não foi vantajoso, uma vez que, acima de uma certa concentração, a redução na contagem de células viáveis deixou de ser proporcional ao aumento na concentração de FS. Embora o ERI na sua forma aniônica seja hidrofílico em altas concentrações, formam-se autoagregados do composto, uma das principais limitações à eficácia da TFD [41,50]. Esse efeito ocorre porque as propriedades fotofísicas do FS são alteradas, principalmente pela modificação do seu espectro de absorção (menor

intensidade de absorção; banda mais larga) [51]. No entanto, o efeito mais drástico está associado à desativação do estado excitado por vias não radiativas (colisões no autoagregado), o que reduzirá o rendimento quântico do oxigênio singlete ($\phi\Delta^1\text{O}_2$) ou até mesmo o extinguirá [52]. Além disso, as espécies autoagregantes, em geral, dificultarão ou impedirão a ligação do FS à membrana celular. Da mesma forma, outro estudo envolvendo TFD contra *E. coli* também relatou uma possível relação entre a formação de agregados de FS com o aumento das concentrações e a contagem de células viáveis [53].

O segundo modelo apresentou uma falta de ajuste, mesmo sendo estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Na avaliação da adequação do modelo por ANOVA, R^2 e EQM podem ser considerados suficientes; a relação F regressão/resíduos é $\geq F$ tabulada. No entanto, a condição de F falta de ajuste/erro puro $\leq F$ tabulada pode não ser atendida, indicando que o modelo tem uma falta de ajuste significativa. De fato, isso também pode ocorrer quando a falta de ajuste é baixa, mas o erro puro é quase zero. Isso se torna uma questão matemática, pois a relação F falta de ajuste/erro puro será um número grande, resultando na interpretação incorreta dos dados. Assim, a tabela de ANOVA deve ser avaliada com cuidado. Essa falta de ajuste não invalida o modelo, mostrando que ele pode ser ajustado para avaliar a resposta.

Para *E. coli* O157 EDL 93, todos os termos foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$), sendo o efeito linear do tempo (b_1) o mais significativo no modelo. Isso também foi observado para outras cepas bacterianas, indicando que o tempo tem uma influência mais significativa na inativação de *E. coli* O157 EDL 933. Com base nesses resultados, a metodologia de superfície de resposta pode ser uma ferramenta excelente para alcançar parâmetros ideais na TFD. Neste estudo, o delineamento forneceu informações precisas sobre a influência combinada da concentração de ERI e do tempo de irradiação com luz LED verde na atividade fotoinibitória contra diferentes cepas de *E. coli*. De acordo com os resultados do delineamento, a variável tempo de exposição à luz teve uma influência mais significativa na inativação das bactérias avaliadas em comparação com a variável concentração de ERI. O algoritmo sequencial indicou as condições ideais para alcançar a inibição total das bactérias: 116 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ERI e 30 min (33,34 J cm^2) de luz verde para *E. coli* ATCC 25922, 108 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 40 min (44,38 J cm^2) para *E. coli* ATCC 35218, e 108 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 29,3 min (32,5 J cm^2) para *E. coli* O157 EDL 933; essas condições foram validadas em testes laboratoriais. Considerando o limite diário de ingestão aceitável recomendado pelo Comitê Conjunto de Especialistas em Aditivos Alimentares da FAO/OMS (JECFA) de 0,1 mg/kg de peso corporal, as

concentrações utilizadas nas condições experimentais ótimas estão dentro dos padrões estabelecidos [23]. O delineamento experimental possibilita a realização de análises onde vários parâmetros são considerados simultaneamente, reduzindo o número de testes, custos e tempo para obter resultados. Portanto, o uso da metodologia de superfície de resposta combinada com TFD é uma abordagem promissora para otimizar a inativação das cepas estudadas neste trabalho.

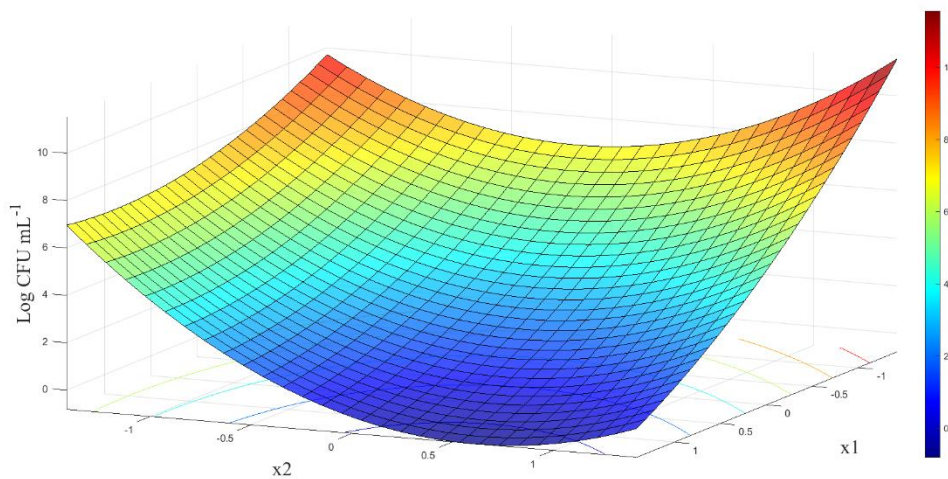


Fig. 5. Superfície de resposta para contagem de células viáveis em função de x_1 (tempo de exposição) e x_2 (concentração) para *E. coli* O157 EDL.

REFERÊNCIAS

- [1] M. Wainwright, T. Maisch, S. Nonell, K. Plaetzer, A. Almeida, G.P. Tegos, M.R. Hamblin, Photoantimicrobials—are we afraid of the light?, *Lancet Infect Dis* 17 (2017) e49–e55. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30268-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30268-7).
- [2] N. Kashef, Y.Y. Huang, M.R. Hamblin, Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale, *Nanophotonics* 6 (2017) 853–879. <https://doi.org/10.1515/nanoph-2016-0189>.
- [3] L. do Prado-Silva, A.T.P.C. Gomes, M.Q. Mesquita, I.A. Neri-Numa, G.M. Pastore, M.G.P.M.S. Neves, M.A.F. Faustino, A. Almeida, G.Ú.L. Braga, A.S. Sant’Ana, Antimicrobial photodynamic treatment as an alternative approach for *Alicyclobacillus acidoterrestris* inactivation, *Int J Food Microbiol* 333 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108803>.
- [4] Z. Luksiene, E. Paskeviciute, Novel approach to the microbial decontamination of strawberries: Chlorophyllin-based photosensitization, *J Appl Microbiol* 110 (2011) 1274–1283. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04986.x>.
- [5] J.E. Hyun, S.K. Moon, S.Y. Lee, Application of blue light-emitting diode in combination with antimicrobials or photosensitizers to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut apples and cherry tomatoes, *Food Control* 131 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108453>.
- [6] Y. Guo, M. Zeng, Y. Yuan, M. Yuan, Y. Chen, H. Yu, R. Liu, Z. Ruan, Q. Xie, X. Jiao, T. Lu, Photodynamic therapy treats acne by altering the composition of the skin microbiota, *Skin Research and Technology* 29 (2023). <https://doi.org/10.1111/srt.13269>.
- [7] J.J. Shen, G.B.E. Jemec, M.C. Arendrup, D.M.L. Saunte, Photodynamic therapy treatment of superficial fungal infections: A systematic review, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 31 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101774>.
- [8] A. Bekmukhametova, H. Ruprai, J.M. Hook, D. Mawad, J. Houang, A. Lauto, Photodynamic therapy with nanoparticles to combat microbial infection and resistance, *Nanoscale* 12 (2020) 21034–21059. <https://doi.org/10.1039/d0nr04540c>.
- [9] Q. Jia, Q. Song, P. Li, W. Huang, Rejuvenated Photodynamic Therapy for Bacterial Infections, *Adv Healthc Mater* 8 (2019). <https://doi.org/10.1002/adhm.201900608>.
- [10] P.C.V. Conrado, A.A. Vaine, G.S. Arita, K.M. Sakita, R.S. Gonçalves, W. Caetano, M. de Souza, M.L. Baesso, L.C. Malacarne, E. Razzolini, V.A. Vicente, E.S. Kioshima, P. de S.B. de Mendonça, Promising onychomycosis treatment

- with hypericin-mediated photodynamic therapy: Case reports, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 42 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2023.103498>.
- [11] J. Oyama, Á.C. Fernandes Herculano Ramos-Milaré, D.S.S. Lopes Lera-Nonose, V. Nesi-Reis, I. Galhardo Demarchi, S.M. Alessi Aristides, J. Juarez Vieira Teixeira, T. Gomes Verzignassi Silveira, M.V. Campana Lonardoni, Photodynamic therapy in wound healing in vivo: a systematic review, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 30 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101682>.
- [12] A. Claudia Pedrozo da Silva, C. Fabiano de Freitas, C. Aparecida Errerías Fernandes Cardinali, T. Lazarotto Braga, W. Caetano, M. Ida Bonini Ravanelli, N. Hioka, A. Luiz Tessaro, Biotin-functionalized silica nanoparticles loaded with Erythrosine B as selective photodynamic treatment for Glioblastoma Multiforme, *J Mol Liq* 345 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117898>.
- [13] L.R. Carobeli, L.E. de F. Meirelles, G.M.Z.F. Damke, E. Damke, M.V.F. de Souza, N.L. Mari, K.H. Mashiba, C.S. Shinobu-Mesquita, R.P. Souza, V.R.S. da Silva, R.S. Gonçalves, W. Caetano, M.E.L. Consolaro, Phthalocyanine and its formulations: A promising photosensitizer for cervical cancer phototherapy, *Pharmaceutics* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122057>.
- [14] M.V.F. de Souza, C.S. Shinobu-Mesquita, L.E.F. Meirelles, N.L. Mari, G.B. César, R.S. Gonçalves, W. Caetano, E. Damke, V.R.S. Silva, G.M.Z.F. Damke, M.E.L. Consolaro, Effects of Hypericin Encapsulated on Pluronic F127 Photodynamic Therapy Against Triple Negative Breast Cancer, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 23 (2022) 1741–1751. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2022.23.5.1741>.
- [15] K.H. Mashiba, L.R. Carobeli, M.V.F. De Souza, L.E. De Freitas Meirelles, N.L. Mari, G.B. César, R.S. Gonçalves, W. Caetano, E. Damke, V.R.S. Da Silva, G.M.Z.F. Damke, M.E.L. Consolaro, Selective photodynamic effects on cervical adenocarcinoma cells provided by f127 pluronic®-based micelles modulating hypericin delivery, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 59 (2023). <https://doi.org/10.1590/s2175-97902023e22459>.
- [16] P.C.V. Conrado, K.M. Sakita, G.S. Arita, C.B. Galinari, R.S. Gonçalves, L.D.G. Lopes, M.V.C. Lonardoni, J.J.V. Teixeira, P.S. Bonfim-Mendonça, E.S. Kioshima, A systematic review of photodynamic therapy as an antiviral treatment: Potential guidance for dealing with SARS-CoV-2, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 34 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102221>.
- [17] A. La Selva, R.M. Negreiros, D.T. Bezerra, E.P. Rosa, V.C.S. Pavesi, R.S. Navarro, M.S. Bello-Silva, K.M. Ramalho, A.C.C. Aranha, P.H. Braz-Silva, K.P.S. Fernandes, S.K. Bussadori, A.C.R.T. Horliana, Treatment of herpes labialis by photodynamic therapy: Study protocol clinical trial (SPIRIT

- compliant), *Medicine (United States)* 99 (2020).
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000019500>.
- [18] S. Wood, D. Metcalf, D. Devine, C. Robinson, Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57 (2006) 680–684.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkl021>.
- [19] A. Teerakapong, T. Damrongrungruang, S. Sattayut, N.P. Morales, S. Tantananugool, Efficacy of erythrosine and cyanidin-3-glucoside mediated photodynamic therapy on *Porphyromonas gingivalis* biofilms using green light laser, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 20 (2017) 154–158.
<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.09.001>.
- [20] A.C.B.P. Costa, V.M. De Campos Rasteiro, C.A. Pereira, E.S.H. Da Silva Hashimoto, M. Beltrame, J.C. Junqueira, A.O.C. Jorge, Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy, *Arch Oral Biol* 56 (2011) 1299–1305.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.05.013>.
- [21] M.L.L. Gonçalves, A.P.T. Sobral, J.M.A.S. Gallo, T. Gimenez, E.P. Ferri, S. Ianello, P. de B. Motta, L.J. Motta, A.C.R.T. Horliana, E.M. Santos, S.K. Bussadori, Antimicrobial photodynamic therapy with erythrosine and blue light on dental biofilm bacteria: study protocol for randomised clinical trial, *BMJ Open* 13 (2023) e075084. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2023-075084>.
- [22] S. Dey, B.H. Nagababu, Applications of food color and bio-preservatives in the food and its effect on the human health, *Food Chemistry Advances* 1 (2022) 100019. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100019>.
- [23] JEFCA, Evaluation of certain food additives: eighty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives., (2019).
- [24] N.N. Yassunaka, C.F. de Freitas, B.R. Rabello, P.R. Santos, W. Caetano, N. Hioka, T.U. Nakamura, B.A. de Abreu Filho, J.M.G. Mikcha, Photodynamic Inactivation Mediated by Erythrosine and its Derivatives on Foodborne Pathogens and Spoilage Bacteria, *Curr Microbiol* 71 (2015) 243–251.
<https://doi.org/10.1007/s00284-015-0827-5>.
- [25] A.F. Silva, A. Borges, C.F. Freitas, N. Hioka, J.M.G. Mikcha, M. Simões, Antimicrobial photodynamic inactivation mediated by Rose Bengal and erythrosine is effective in the control of food-related bacteria in planktonic and biofilm states, *Molecules* 23 (2018). <https://doi.org/10.3390/molecules23092288>.
- [26] V.R. Batistela, D.S. Pellosi, F.D. De Souza, W.F. Da Costa, S.M. De Oliveira Santin, V.R. De Souza, W. Caetano, H.P.M. De Oliveira, I.S. Scarminio, N. Hioka, PKa determinations of xanthene derivates in aqueous solutions by

- multivariate analysis applied to UV-Vis spectrophotometric data, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 79 (2011) 889–897.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.03.027>.
- [27] E. Gandin, Y. Lion, A. Van de Vorst, QUANTUM YIELD OF SINGLET OXYGEN PRODUCTION BY XANTHENE DERIVATIVES, *Photochem Photobiol* 37 (1983) 271–278. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1983.tb04472.x>.
- [28] B.M.D.F. de Carvalho, B.A. Garcia, A.K.P. Gomes, D.D. Alcantara, K.M. de Freitas Pontes, Antimicrobial Photodynamic Therapy as a Technique for Decontamination of Acrylic Resin Devices Provided by Different Dental Laboratories, *J Lasers Med Sci* 14 (2023).
<https://doi.org/10.34172/JLMS.2023.08>.
- [29] M. Lisboa, C. Chagas, J.C.M. da Costa, D. Rossoni, J.M.G. Mikcha, J.V. de O. Silva, A. Batista, W. Caetano, G.S. Madrona, L.A.C. Tonon, M.S. dos S. Pozza, A.P. Stafussa, M.R. da S. Scapim, Characterization and effect of edible alginate acidified coatings associated with photodynamics on cheese preservation, *Applied Food Research* 2 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100113>.
- [30] G.L. Cho, J.W. Ha, Erythrosine B (Red Dye No. 3): A potential photosensitizer for the photodynamic inactivation of foodborne pathogens in tomato juice, *J Food Saf* 40 (2020). <https://doi.org/10.1111/jfs.12813>.
- [31] Y. Liu, W. Dong, S. Shen, F. Meng, J. Wang, K. Yang, D. Lin, Enhancement of *E. coli* inactivation by photosensitized erythrosine-based solar disinfection under weakly acidic conditions, *Water Res* 212 (2022).
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118125>.
- [32] A.R. Santos, A.F. da Silva, A.F.P. Batista, C.F. Freitas, E. Bona, M.J. Sereia, W. Caetano, N. Hioka, J.M.G. Mikcha, Application of response surface methodology to evaluate photodynamic inactivation mediated by Eosin Y and 530 nm LED AGAINST staphylococcus aureus, *Antibiotics* 9 (2020) 2–11.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9030125>.
- [33] K. Bheemanapally, M.M.H. Ibrahim, K.P. Briski, HPLC–electrospray ionization–mass spectrometry optimization by high-performance design of experiments for astrocyte glutamine measurement, *Journal of Mass Spectrometry* 56 (2021). <https://doi.org/10.1002/jms.4680>.
- [34] D.C. MONTGOMERY, Design and analysis of experiments, eighth ed., Hoboken, 2013.
- [35] M.P. Callao, Multivariate experimental design in environmental analysis, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 62 (2014) 86–92.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.07.009>.

- [36] N. Nasirizadeh, H. Dehghanizadeh, M.E. Yazdanshenas, M.R. Moghadam, A. Karimi, Optimization of wool dyeing with rutin as natural dye by central composite design method, *Ind Crops Prod* 40 (2012) 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.03.035>.
- [37] B.R. Rabello, W. Caetano, Light dosimetry effectively absorbed (DABs) by methylene blue in photosensitization processes employing polychromatic light sources, *Quim Nova* 41 (2018) 920–925. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170243>.
- [38] A.F. Silva, A.R. dos Santos, D.A.C. Trevisan, E. Bonin, C.F. Freitas, A.F.P. Batista, N. Hioka, M. Simões, J.M. Graton Mikcha, Xanthene Dyes and Green LED for the Inactivation of Foodborne Pathogens in Planktonic and Biofilm States, *Photochem Photobiol* 95 (2019) 1230–1238. <https://doi.org/10.1111/php.13104>.
- [39] A.R. dos Santos, A.F. da Silva, C.F. de Freitas, M. V. da Silva, E. Bona, C. V. Nakamura, N. Hioka, J.M.G. Mikcha, Response surface methodology can be used to predict photoinactivation of foodborne pathogens using Rose Bengal excited by 530 nm LED, *J Food Saf* 40 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.1111/jfs.12736>.
- [40] V.H.C. Dias, A.M. Malacrida, A.R. dos Santos, A.F.P. Batista, P.A.Z. Campanerut-Sá, G. Braga, E. Bona, W. Caetano, J.M.G. Mikcha, pH interferes in photoinhibitory activity of curcumin nanoencapsulated with pluronic® P123 against *Staphylococcus aureus*, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 33 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102085>.
- [41] J.M.D. Calmeiro, S.R.D. Gamelas, A.T.P.C. Gomes, M.A.F. Faustino, M.G.P.M.S. Neves, A. Almeida, J.P.C. Tomé, L.M.O. Lourenço, Versatile thiopyridyl/pyridinone porphyrins combined with potassium iodide and thiopyridinium/methoxypyridinium porphyrins on *E. coli* photoinactivation, *Dyes and Pigments* 181 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108476>.
- [42] M. Cossu, L. Ledda, A. Cossu, Emerging trends in the photodynamic inactivation (PDI) applied to the food decontamination, *Food Research International* 144 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110358>.
- [43] T.D. Le, P. Phasupan, L.T. Nguyen, Antimicrobial photodynamic efficacy of selected natural photosensitizers against food pathogens: Impacts and interrelationship of process parameters, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 32 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102024>.
- [44] M.J. Kim, C.H. Tang, W.S. Bang, H.G. Yuk, Antibacterial effect of 405 ± 5 nm light emitting diode illumination against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* on the surface of fresh-cut mango and its

- influence on fruit quality, *Int J Food Microbiol* 244 (2017) 82–89.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.023>.
- [45] X. Moreira, P. Santos, M.A.F. Faustino, M.M.M. Raposo, S.P.G. Costa, N.M.M. Moura, A.T.P.C. Gomes, A. Almeida, M.G.P.M.S. Neves, An insight into the synthesis of cationic porphyrin-imidazole derivatives and their photodynamic inactivation efficiency against *Escherichia coli*, *Dyes and Pigments* 178 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108330>.
- [46] L. do Prado-Silva, V.O. Alvarenga, G.Ú.L. Braga, A.S. Sant’Ana, Inactivation kinetics of *Bacillus cereus* vegetative cells and spores from different sources by antimicrobial photodynamic treatment (aPDT), *LWT* 142 (2021).
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111037>.
- [47] L. do Prado-Silva, G.T.P. Brancini, G.Ú.L. Braga, X. Liao, T. Ding, A.S. Sant’Ana, Antimicrobial photodynamic treatment (aPDT) as an innovative technology to control spoilage and pathogenic microorganisms in agri-food products: An updated review, *Food Control* 132 (2022).
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108527>.
- [48] I. Santos, S.R.D. Gamelas, C. Vieira, M.A.F. Faustino, J.P.C. Tomé, A. Almeida, A.T.P.C. Gomes, L.M.O. Lourenço, Pyrazole-pyridinium porphyrins and chlorins as powerful photosensitizers for photoinactivation of planktonic and biofilm forms of *E. coli*, *Dyes and Pigments* 193 (2021).
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109557>.
- [49] FDA, Color Additives History, Food and Drug Administration (2022).
<https://www.fda.gov/industry/color-additives/color-additives-history> (accessed June 19, 2022).
- [50] H. Liang, J. Xu, Y. Liu, J. Zhang, W. Peng, J. Yan, Z. Li, Q. Li, Optimization of hydrogel containing toluidine blue O for photodynamic therapy by response surface methodology, *J Photochem Photobiol B* 173 (2017) 389–396.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.06.019>.
- [51] C.F. de Freitas, N.L. da Rocha, I.S. Pereverzieff, V.R. Batistela, L.C. Malacarne, N. Hioka, W. Caetano, Potential of triblock copolymers Pluronic® P-84 and F-108 with erythrosine B and its synthetic ester derivatives for photodynamic applications, *J Mol Liq* 322 (2021).
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114904>.
- [52] O. Valdes-Aguilera, D.C. Neckers, Aggregation phenomena in xanthene dyes, *Acc Chem Res* 22 (1989) 171–177. <https://doi.org/10.1021/ar00161a002>.
- [53] L.S. Amaral, E.B. Azevedo, J.R. Perussi, The response surface methodology speeds up the search for optimal parameters in the photoinactivation of *E. coli* by

photodynamic therapy, Photodiagnosis Photodyn Ther 22 (2018) 26–33.
<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.02.020>.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Apêndice A. Estudos da terapia fotodinâmica mediada por Eritrosina (ERI) contra *Escherichia coli*

Concentração de ERI	Fonte de Luz	Descrição da fonte de luz	Referências
50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	LED azul (twin flex II multifunctional system, MM Optics, São Carlos, Brazil)	Dados não mostrados	[1]
1×10^{-5} e 1×10^{-6} mol L^{-1}	LED verde (λ max 510 nm)	Potência 315 J cm^2 – 394 J cm^2 : 0,4 W	[2]
500 mg mL	Módulo de LED verde e branco	25 W	[3]
0,01 até 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	LED verde (530 $\pm$ 40 nm)	10 mW cm^2	[4]
2,2 mmol L^{-1}	Luz de trabalho portátil de LED 3500 lm Husky	Dados não mostrados	[5]
100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Lâmpada de arco de xenônio (Osram, Munich, Germany)	Potência: 100 W, taxa de fluência: 0,4 mW cm^2	[6]
100 μg	LED verde (510 nm)	0,4 W	[7]
2,5 mg L^{-1}	Lâmpada de xenônio	200 mW cm^2	[8]
22 $\mu\text{mol L}^{-1}$	LED (520 nm)	Potência: 90 mW, Trabalho: 30 J, Fluência: 38 J cm^2	[9]
0,631 mmol L^{-1}	LED verde	7,2 W	[10]

Biofilme de amido com ERI (1, 3 e 5 % do peso do amido)	LED em espectro visível completo	Densidade de energia de 3,6 J cm ² , 10 W	[11]
---	----------------------------------	--	------

REFERÊNCIAS

- [1] R.D. Rossoni, J.C. Junqueira, E.L.S. Santos, A.C.B. Costa, A.O.C. Jorge, Comparison of the efficacy of Rose Bengal and erythrosin in photodynamic therapy against *Enterobacteriaceae*, *Lasers Med Sci.* 25 (2010) 581–586. <https://doi.org/10.1007/s10103-010-0765-1>.
- [2] N.N. Yassunaka, C.F. de Freitas, B.R. Rabello, P.R. Santos, W. Caetano, N. Hioka, T.U. Nakamura, B.A. de Abreu Filho, J.M.G. Mikcha, Photodynamic Inactivation Mediated by Erythrosine and its Derivatives on Foodborne Pathogens and Spoilage Bacteria, *Curr Microbiol.* 71 (2015) 243–251. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0827-5>.
- [3] S.C. Shi, W.K. Huang, Evaluation of photodynamic inactivation efficiency using conventional and decorative light-emitting diode lamps, *Sensors and Materials.* 29 (2017) 1569–1577. <https://doi.org/10.18494/SAM.2017.1705>.
- [4] A.F. Silva, A. Borges, C.F. Freitas, N. Hioka, J.M.G. Mikcha, M. Simões, Antimicrobial photodynamic inactivation mediated by Rose Bengal and erythrosine is effective in the control of food-related bacteria in planktonic and biofilm states, *Molecules.* 23 (2018). <https://doi.org/10.3390/molecules23092288>.
- [5] A. Contreras, M.J. Raxworthy, S. Wood, J.D. Schiffman, G. Tronci, Photodynamically Active Electrospun Fibers for Antibiotic-Free Infection Control, *ACS Appl Bio Mater.* 2 (2019) 4258–4270. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00543>.
- [6] G.L. Cho, J.W. Ha, Erythrosine B (Red Dye No. 3): A potential photosensitizer for the photodynamic inactivation of foodborne pathogens in tomato juice, *J Food Saf.* 40 (2020). <https://doi.org/10.1111/jfs.12813>.
- [7] M. Lisboa, C. Chagas, J.C.M. da Costa, D. Rossoni, J.M.G. Mikcha, J.V. de O. Silva, A. Batista, W. Caetano, G.S. Madrona, L.A.C. Tonon, M.S. dos S. Pozza, A.P. Stafussa, M.R. da S. Scapim, Characterization and effect of edible alginate acidified coatings associated with photodynamics on cheese preservation, *Applied Food Research.* 2 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100113>.
- [8] Y. Liu, W. Dong, S. Shen, F. Meng, J. Wang, K. Yang, D. Lin, Enhancement of *E. coli* inactivation by photosensitized erythrosine-based solar disinfection under weakly acidic conditions, *Water Res.* 212 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118125>.
- [9] B.M.D.F. de Carvalho, B.A. Garcia, A.K.P. Gomes, D.D. Alcantara, K.M. de Freitas Pontes, Antimicrobial Photodynamic Therapy as a Technique for Decontamination of Acrylic Resin Devices Provided by Different Dental Laboratories, *J Lasers Med Sci.* 14 (2023). <https://doi.org/10.34172/JLMS.2023.08>.
- [10] S.C. Shi, S.W. Yang, Y.C. Xu, F.I. Lu, The Synergic Effect of Erythrosine and Gold Nanoparticles in Photodynamic Inactivation, *Sustainability (Switzerland).* 15 (2023). <https://doi.org/10.3390/su15043621>.

- [11] S. Zhu, R.H. Ukwatta, X. Cai, Y. Zheng, F. Xue, C. Li, L. Wang, The physiochemical and photodynamic inactivation properties of corn starch/erythrosine B composite film and its application on pork preservation, *Int J Biol Macromol.* 225 (2023) 112–122. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.080>.

CAPÍTULO 2: Terapia fotodinâmica com Eritrosina na inativação de *Escherichia coli* em suco de morango industrializado

Vanessa Carvalho Rodrigues^a, João Guilherme Buzetto Tsuchiya^b, Adriele Rodrigues dos Santos^b, Evandro Bona^{c,d}, Camila Fabiano Freitas^{e,f}, Luis Carlos Malacarne^h, Jane Martha Graton Mikcha^{a,g}

^aPrograma de pós-graduação de ciência de alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil

^bCoordenação experimental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

^cPrograma de pós-graduação de tecnologia de alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

^dPrograma de pós-graduação de química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

^eDepartamento de química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil

^fDepartamento de química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

^gDepartamento de análises clínicas e biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil

^hDepartamento de física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil

Autor correspondente:

Vanessa Carvalho Rodrigues: cr.nessa@gmail.com; Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790 - Jd. Universitário, 87020-900 Maringá, PR, Brasil

RESUMO

INTRODUÇÃO: A terapia fotodinâmica (TFD) é um método de inativação de micro-organismos que tem ganhado popularidade em diversas áreas. Embora já seja utilizada na medicina, a aplicação na indústria alimentícia é recente. A TFD apresenta alta eficiência, é ecologicamente correta e apresenta baixa resistência microbiana. Devido essas vantagens, pesquisadores têm explorado a TFD como uma nova estratégia para inativar micro-organismos em alimentos.

MATERIAIS E MÉTODOS: Este estudo utilizou um delineamento experimental para avaliar diferentes concentrações de eritrosina B (ERI) e tempos de exposição à luz verde para determinar a eficácia da TFD na inativação de *E. coli* ATCC 25922 em suco industrializado de morango.

RESULTADOS: O modelo matemático foi válido para fazer previsões, com capacidade preditiva de variação de resultados de 97,32%. Os resultados mostraram que a combinação de 5,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ERI e 6 minutos de iluminação foi capaz de inativar o micro-organismo estudado.

CONCLUSÃO: A TDF pode ser uma alternativa eficiente e segura aos métodos tradicionais de conservação de alimentos sem comprometer a qualidade do produto.

Palavras-chave: Fotoinativação, Eritrosina, Conservação de alimentos, Xantenos.

1. INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (TFD) é um método de esterilização que vem sendo cada vez mais aplicada em diversas áreas [1-6]. Esta técnica é baseada na combinação de luz no comprimento de onda apropriado, um composto fotossensibilizador (FS) e oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$). As vantagens da TFD são: não produz produtos químicos tóxicos, a única energia necessária é a fonte de luz e a possibilidade de causar resistência microbiana é baixa devido a sua natureza multialvos [7,8].

Embora a TFD seja utilizada principalmente na área médica, ainda é menos estudado na área de alimentos. Atualmente, os métodos de conservação na indústria alimentícia podem ser amplamente divididos em conservação térmica e tecnologia de conservação não-térmica. A tecnologia de conservação térmica tem uma longa história com ampla aplicação e capacidade de esterilização de amplo espectro, mas seu consumo de energia é alto e pode fazer com que os alimentos percam a nutrição e o sabor original sob altas temperaturas [9].

A TFD vem despertando interesse na indústria alimentícia por não ter sido associada à resistência microbiana. Além disso, é caracterizada por uma alta eficiência e características ecologicamente corretas, quando comparada com outras tecnologias já em uso pela indústria [1]. Em contraste com os métodos tradicionais de pasteurização, a TDF minimiza as alterações nas propriedades nutricionais e sensoriais e atende à crescente demanda dos consumidores por alimentos microbiologicamente seguros [10].

Por estes fatores, pesquisadores começaram a explorar a possibilidade de usar TFD como uma nova estratégia de inativação de micro-organismos. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da TFD mediada por eritrosina B contra *E. coli* ATCC 25922 em suco industrializado de morango.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental

Um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi realizado com intervalos de tempo e concentração de eritrosina (ERI) variando de 2-6 minutos e 1-10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Tabela 1). O modelo quadrático foi ajustado aos dados experimentais seguindo a Equação 1.

$$\log UFC = b_0 + b_1x_1 + b_{11}x_1^2 + b_2x_2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (1)$$

Na Equação 1, $\log UFC$ representa a resposta predita, b_0 é o intercepto, b_1 e b_2 são os coeficientes de regressão para o efeito linear, b_{11} e b_{22} referem-se aos termos quadráticos, e b_{12} é o coeficiente de interação, x_1 é a concentração de ERI e x_2 o tempo de iluminação. A significância do modelo foi avaliada por meio da ANOVA ($p < 0,05$). O coeficiente de determinação (R^2), o coeficiente de determinação ajustado (R^2_{adj}), o erro quadrático médio (EQM) e a falta de ajuste foram utilizados para avaliar o desempenho preditivo do modelo. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o *software* MATLAB R2022a.

2.2 Sistema de díodos emissores de luz (LED) e dose de luz

O protótipo do sistema de iluminação foi composto por uma matriz de 20 LEDs verde de potência de 3W. O sistema de LED foi projetado tanto óptica quanto mecanicamente (com paredes internas espelhadas) para obter uma área de irradiação homogênea ($> 90\%$) para a iluminação de culturas celulares utilizando microplacas de 24 poços. Um controlador automatizado permitiu o ajuste da irradiância (mW cm^{-2}) e da fluência (J cm^{-2}) por meio do controle da corrente (regulador PWM) no sistema de LED e do tempo de iluminação. A irradiância espectral da câmara de LED foi determinada utilizando um radiômetro (Gooch & Housego, OL 756) acoplado a uma fibra óptica (Gooch & Housego, OL 730 7q-1.0) e a uma esfera integradora de 50,8 mm de diâmetro (Gooch & Housego, IS-270) para fornecer a densidade de potência. O espectro de emissão do LED apresentou um pico em 517 nm e uma largura de banda de 36 nm. A irradiância total foi determinada pela área sob a curva (integração da irradiância espectral). As doses de luz (DAbs) foram calculadas conforme descrito por Rodrigues et al. [11].

Tabela 1: Delineamento experimental (valores codificados e reais) utilizado para determinar a influência combinada de duas variáveis independentes (concentração de eritrosina e tempo de irradiação) na viabilidade de *E. coli* ATCC 25922 em suco de morango.

Experimentos	Valores codificados		Valores reais			<i>E. coli</i> ATCC 25922	
	x ₁	x ₂	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Tempo (min.)	Irradiância absorvida (mWcm^{-2})	Dose de luz (J cm^{-2})	Viabilidade celular (Log UFC mL^{-1})
Controle	-	-	0,00	0,00	-	-	7,23 $\pm$ 0,03
1	-1	-1	2,32	3,17	0,13	0,069	6,35 $\pm$ 0,02
2	-1	1	2,32	8,83	0,33	0,063	4,20 $\pm$ 0,01
3	1	-1	8,68	3,17	0,33	0,174	2,32 $\pm$ 0,35
4	1	1	8,68	8,83	0,11	0,040	0,00 ^a $\pm$ 0,00
5	-1,41421	0	1,00	6,00	0,44	0,158	7,02 $\pm$ 0,03
6	1,41421	0	10,00	6,00	0,29	0,035	1,52 ^b $\pm$ 0,00
7	0	-1,41421	5,50	2,00	0,29	0,174	5,22 $\pm$ 0,05
8	0	1,41421	5,50	10,00	0,29	0,104	0,00 ^a $\pm$ 0,00
9	0	0	5,50	6,00	0,29	0,104	0,00 ^a $\pm$ 0,00
10	0	0	5,50	6,00	0,29	0,104	0,00 ^a $\pm$ 0,00
11	0	0	5,50	6,00	0,29	0,104	0,00 ^a $\pm$ 0,00
12	0	0	5,50	6,00	0,29	0,104	0,00 ^a $\pm$ 0,00
13	0	0	5,50	6,00	0,29	0,104	0,00 ^a $\pm$ 0,00

^aNenhum crescimento bacteriano dentro do limite de detecção da técnica. ^bResultado abaixo do limite de detecção da técnica.

2.3 Terapia fotodinâmica

Neste estudo foi utilizada cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922. Para cada ensaio, a bactéria foi previamente cultivada em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Difco™) a 37 °C por 16 horas. As células foram centrifugadas (4500x g/5 minutos), lavadas três vezes e ressuspensas em solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH: 7,2). A densidade celular foi padronizada em espectrofotômetro em 10^7 UFC mL⁻¹ para utilização nas análises.

2.3.1 Controles

Inicialmente foram realizados testes *in vitro* para verificar a influência de cada componente na ação da TFD contra *E. coli* ATCC 25922. As variáveis tempo de iluminação e concentração de ERI foram definidas a partir de estudos anteriores (Rodrigues et al., 2024).

Teste 1 - solução salina pH 3,5 com inóculo bacteriano, sem iluminação e sem FS;

Teste 2 - solução salina pH 3,5 com inóculo bacteriano, sem iluminação, com FS (ERI, 116 µmol L⁻¹);

Teste 3 - solução salina pH 3,5 com inóculo bacteriano, iluminada (30 minutos), sem FS;

Teste 4 - tampão PBS pH 7,2 com inóculo bacteriano, sem iluminação, sem FS,

Teste 5 - tampão PBS pH 7,2 com inóculo bacteriano, sem iluminação, com FS (ERI, 116 µmol L⁻¹);

Teste 6 - tampão PBS pH 7,2 com inóculo bacteriano, com iluminação (30 minutos), sem FS;

Teste 7 - suco de morango com inóculo bacteriano, sem iluminação, sem FS;

Teste 8 - suco de morango com inóculo bacteriano, sem iluminação, com FS (ERI, 116 µmol L⁻¹);

Teste 9 - suco de morango com inóculo bacteriano, com iluminação (30 minutos), sem FS.

2.3.2 Aplicação da TFD em suco industrializado de morango

Foram utilizadas amostras de suco de morango industrializado adquiridas em rede de mercado localizada na cidade de Campo Mourão. As amostras de suco de morango a serem analisadas foram preparadas conforme condições experimentais determinadas no delineamento experimental (Tabela 1). A análise da TFD foi realizada de acordo com

Rodrigues *et al.* [11]. Em uma placa de 24 poços, suco de morango com ERI e bactéria foram incubadas no escuro por 10 minutos e posteriormente iluminadas com luz de LED verde de acordo com o tempo estipulado para cada experimento. Em seguida, as amostras foram diluídas em solução salina 0,85% e semeadas em triplicata em ágar Müller Hinton (MHA, HiMedia). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e os resultados expressos em Log UFC mL⁻¹.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a eficiência da TFD usando ERI e LED verde contra *E. coli* ATCC 25922 em suco industrializado de morango. Inicialmente foram realizados testes *in vitro* para verificar a influência de cada variável independente na inativação da bactéria em estudo na TFD. Nenhuma das condições testadas reduziu a contagem de *E. coli*, o que indica que a eficiência da técnica depende da ação conjunta de todos os parâmetros.

Foi utilizado um DCCR para avaliar a eficiência da TFD em suco industrializado de morango. A faixa de valores de tempo de iluminação e concentração de ERI foi determinada em estudos prévios (dados não mostrados).

O modelo foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$) com $R^2 = 0,9822$ e $R^2_{adj} = 0,9732$, não apresentando falta de ajuste. Os coeficientes que apresentaram significância estatística ($p < 0,05$) foram: do intercepto; de regressão para o efeito linear para as duas variáveis (x_1 e x_2) e, os dos termos quadráticos, também para as duas variáveis, conforme mostra a Equação (2).

$$\log UFC = 0,20 - 2,00x_1 - 1,48x_1^2 - 1,98x_2 + 1,15x_2^2 \quad (2)$$

A capacidade preditiva indica que 97,32% da variação total dos resultados pode ser explicada pelo modelo. Santos e colaboradores [12,13] utilizaram o mesmo modelo matemático para fazer a previsão da TFD com corantes xantenos e LED verde para inativação *in vitro* de *Salmonella* Typhimurium e *Staphylococcus aureus*, e, obtiveram modelos com capacidade preditiva de 78,79% e 91,59%, respectivamente. A Tabela 2 mostra os valores de resíduos, que correspondem à relação entre resultados obtidos nos experimentos e os valores previstos calculados conforme condições estabelecidas. Com exceção do experimento 7, o modelo apresentou resíduos abaixo de 0,5 log UFC mL⁻¹.

Tabela 2: Valores observados, previstos e residuais para os dados apresentados no delineamento experimental.

Experimentos	Observado (Log UFC mL ⁻¹)	Previsto (Log UFC mL ⁻¹)	Resíduo (Log UFC mL ⁻¹)
1	6,35	6,81	-0,46
2	4,21	3,85	0,35
3	2,32	2,81	-0,49
4	0,00	-0,15	0,15
5	7,02	6,99	0,03
6	1,52	1,33	0,19
7	5,22	4,59	0,63
8	0,00	0,40	-0,40
9	0,00	0,20	-0,20
10	0,00	0,20	-0,20
11	0,00	0,20	-0,20
12	0,00	0,20	-0,20
13	0,00	0,20	-0,20

Os dados experimentais do modelo e resultados de viabilidade celular da TFD mediada por ERI contra *E. coli* em suco de morango estão expostos na Tabela 1. As reduções variaram de 0,2 Log UFC mL⁻¹ até total inativação da bactéria avaliada, quando comparadas ao controle. Os experimentos 4 e 8 e os pontos centrais 9, 10, 11, 12 e 13 alcançaram a inativação total de *E. coli*, enquanto o experimento 6 apresentou resultado abaixo do limite de detecção da técnica. Os pontos centrais apresentaram inibição total da bactéria em estudo com os menores valores de concentração do FS e tempo de iluminação (5,5 µmol L⁻¹ de ERI e 6 minutos) (Figura 1).

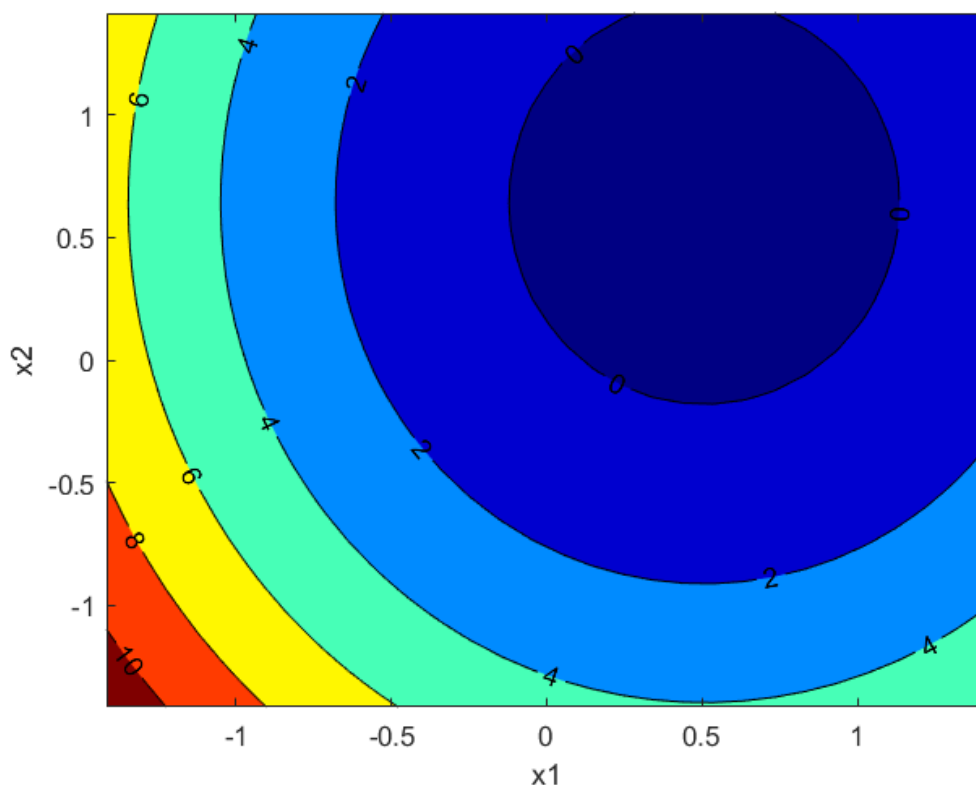


Fig. 1. Superfície de resposta para contagem de células viáveis em função de x_1 (concentração) e x_2 (tempo de exposição) para *E. coli* ATCC 25922.

Estes valores de concentração de ERI e tempo de iluminação são menores quando comparados aos resultados apresentados por Cho e Ha [14], que avaliaram a inativação fotodinâmica mediada por ERI ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 15 minutos) em suco de tomate contra *E. coli* O157:H7 e obtiveram redução de $6,77 \text{ Log UFC mL}^{-1}$. Outros estudos também avaliaram a eficiência da TFD contra *E. coli* com diferentes FSs e fontes de luz em amostras de sucos. Lee et al. [3,15] avaliaram TFD utilizando quercetina em concentrações de $75 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ e luz de LED azul com tempos de iluminação de 34,8 minutos e 52,5 minutos, contra *E. coli* O157:H7, em amostras de suco de uva branca e suco de maçã, respectivamente. As reduções nas contagens de *E. coli* foram de aproximadamente $5,5 \text{ Log UFC mL}^{-1}$ em ambos os sucos. Bhavya e Hebbar [16] estudaram TFD mediada por curcumina e LED azul contra *E. coli* em suco de laranja, com redução de aproximadamente $3 \text{ Log UFC mL}^{-1}$ com $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de curcumina e 180 minutos de iluminação.

Sabe-se que a aplicação da TFD na indústria de alimentos é um grande desafio devido à complexidade de cada matriz alimentar. A eficiência da TFD em sucos pode ser dependente de algumas características do produto como a turbidez da amostra, que

pode impactar na penetração da luz [17] e o pH baixo, que pode causar dano à integridade da parede celular, facilitando a penetração dos FS [10]. Lin et al. [11] avaliaram atributos como transparência e viscosidade em diferentes matrizes alimentares e concluíram que as características da matriz alimentar impactaram significativamente nas atividades bactericidas dos tratamentos fotodinâmicos devido aos diferentes comportamentos da luz utilizada na no estudo.

Muitos estudos mostram que a aplicação da TFD em diversas áreas tem sido promissora. Na indústria de alimentos, mesmo com as dificuldades da complexidade da matriz alimentar, esta técnica pode ser uma alternativa para garantir a inocuidade do produto. Apesar de ser um grande desafio, este estudo mostrou que é possível alcançar a inativação de *E. coli* em suco de morango industrializado.

4. CONCLUSÃO

O modelo foi efetivo em mostrar a eficácia da TFD com ERI e LED verde para controlar *E. coli* em suco de morango industrializado. A TFD mediada por ERI mostrou-se eficiente na inativação de *E. coli* em suco de morango industrializado. Foi evidenciada completa inativação bacteriana no suco tratado com ERI a $5,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 6 minutos de iluminação ($0,104 \text{ J cm}^2$). A TFD pode ser uma estratégia para controle de patógenos de origem alimentar na indústria, entretanto, deve-se considerar o efeito de outras variáveis da matriz alimentar, bem como os efeitos da TFD nas características físico-químicas, nutricionais e sensoriais do produto final.

REFERÊNCIAS

- [1] J. Yu, F. Zhang, J. Zhang, Q. Han, L. Song, X. Meng, Effect of photodynamic treatments on quality and antioxidant properties of fresh-cut potatoes, *Food Chem* 362 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130224>.
- [2] Z. Chai, F. Zhang, B. Liu, X. Chen, X. Meng, Antibacterial mechanism and preservation effect of curcumin-based photodynamic extends the shelf life of fresh-cut pears, *LWT* 142 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110941>.
- [3] I.H. Lee, E.R. Cho, D.H. Kang, The effect of quercetin mediated photodynamic inactivation on apple juice properties at different temperature and its bactericidal mechanism, *Food Control* 144 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109362>.
- [4] C.B. Galinari, P.C.V. Conrado, G.S. Arita, V.A.B. Mosca, R.C. Melo, T. de P. Bianchi, D.R. Faria, K.M. Sakita, L.C. Malacarne, R.S. Gonçalves, P.C. de S. Pereira, G.B. Cesar, W. Caetano, M. de Souza, R. da Silva Palácios, M.L. Baesso, T.I.E. Svidzinski, É.S.K. Cotica, P. de S. Bonfim-Mendonça, Nanoencapsulated hypericin in P-123 associated with photodynamic therapy for the treatment of dermatophytosis, *J Photochem Photobiol B* 215 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112103>.
- [5] P.C.V. Conrado, K.M. Sakita, G.S. Arita, C.B. Galinari, R.S. Gonçalves, L.D.G. Lopes, M.V.C. Lonardoní, J.J.V. Teixeira, P.S. Bonfim-Mendonça, E.S. Kioshima, A systematic review of photodynamic therapy as an antiviral treatment: Potential guidance for dealing with SARS-CoV-2, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 34 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102221>.
- [6] P.C.V. Conrado, K.M. Sakita, G.S. Arita, R.S. Gonçalves, G.B. Cesar, W. Caetano, N. Hioka, M.F. Voidaleski, V.A. Vicente, T.I.E. Svidzinski, P.S. Bonfim-Mendonça, E.S. Kioshima, Hypericin-P123-photodynamic therapy in an ex vivo model as an alternative treatment approach for onychomycosis caused by *Fusarium* spp., *Photodiagnosis Photodyn Ther* 35 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102414>.
- [7] L. do Prado-Silva, G.T.P. Brancini, G.Ú.L. Braga, X. Liao, T. Ding, A.S. Sant'Ana, Antimicrobial photodynamic treatment (aPDT) as an innovative technology to control spoilage and pathogenic microorganisms in agri-food products: An updated review, *Food Control* 132 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108527>.
- [8] N. Kashef, Y.Y. Huang, M.R. Hamblin, Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale, *Nanophotonics* 6 (2017) 853–879. <https://doi.org/10.1515/nanoph-2016-0189>.
- [9] M. Cossu, L. Ledda, A. Cossu, Emerging trends in the photodynamic inactivation (PDI) applied to the food decontamination, *Food Research International* 144 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110358>.

- [10] S. Zhu, Y. Song, J. Pei, F. Xue, X. Cui, X. Xiong, C. Li, The application of photodynamic inactivation to microorganisms in food, *Food Chem X* 12 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100150>.
- [11] V.C. Rodrigues, A.R. dos Santos, E. Bona, C.F. Freitas, J.V. de O. Silva, L.C. Malacarne, M. Machinski Junior, B.A. de Abreu Filho, J.M.G. Mikcha, Optimization of the Erythrosine-mediated photodynamic therapy against *Escherichia coli* using response surface methodology, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 45 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2023.103916>.
- [12] A.R. Santos, A.F. da Silva, A.F.P. Batista, C.F. Freitas, E. Bona, M.J. Sereia, W. Caetano, N. Hioka, J.M.G. Mikcha, Application of response surface methodology to evaluate photodynamic inactivation mediated by Eosin Y and 530 nm LED against *Staphylococcus aureus*, *Antibiotics* 9 (2020) 2–11. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9030125>.
- [13] A.R. dos Santos, A.F. da Silva, C.F. de Freitas, M. V. da Silva, E. Bona, C. V. Nakamura, N. Hioka, J.M.G. Mikcha, Response surface methodology can be used to predict photoinactivation of foodborne pathogens using Rose Bengal excited by 530 nm LED, *J Food Saf* 40 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.1111/jfs.12736>.
- [14] G.L. Cho, J.W. Ha, Erythrosine B (Red Dye No. 3): A potential photosensitizer for the photodynamic inactivation of foodborne pathogens in tomato juice, *J Food Saf* 40 (2020). <https://doi.org/10.1111/jfs.12813>.
- [15] I.H. Lee, S.H. Kim, D.H. Kang, Quercetin mediated antimicrobial photodynamic treatment using blue light on *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*, *Curr Res Food Sci* 6 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.100428>.
- [16] M.L. Bhavya, H.U. Hebbar, Sono-photodynamic inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in orange juice, *Ultrason Sonochem* 57 (2019) 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.05.002>.
- [17] L. do Prado-Silva, A.T.P.C. Gomes, M.Q. Mesquita, I.A. Neri-Numa, G.M. Pastore, M.G.P.M.S. Neves, M.A.F. Faustino, A. Almeida, G.Ú.L. Braga, A.S. Sant’Ana, Antimicrobial photodynamic treatment as an alternative approach for *Alicyclobacillus acidoterrestris* inactivation, *Int J Food Microbiol* 333 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108803>.
- [18] S. Lin, J. Zhang, D. Stekel, Y. Shi, H. Yang, J.B. Gao, B.K. Tan, J. Hu, The food matrix properties influence the antibacterial effectiveness of photodynamic and sonodynamic treatments, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 93 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2024.103630>.