

AVALIAÇÃO IN VITRO DA EFETIVIDADE DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA NA INATIVAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

ASSESSMENT OF ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY FOR IN VITRO INACTIVATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Caroline Rehlander Martins, Ana Cláudia Pavarina, Livia Nordi Dovigo, Ana Paula Dias Ribeiro, ,
Iguatemy Lourenço Brunetti, Eunice Teresinha Giampaolo - Campus de Araraquara – Faculdade de
Odontologia – Odontologia – carolinermartins@foar.unesp.br – PIBIC/CNPq.

Palavras chaves: Fotoquimioterapia, Curcumina, *Staphylococcus aureus*

Keywords: Photochemotherapy, Curcumin, *Staphylococcus aureus*

1. INTRODUÇÃO

Duas das doenças bacterianas mais comuns que afligem os humanos são a cárie e a doença periodontal. Ambas resultam da formação de biofilme, também conhecido como placa dental, nos dentes e nos tecidos moles da boca. A placa dental pode ser definida como uma comunidade complexa e diversificada de microrganismos encontrados sobre a superfície dentária. Nesse biofilme, os microrganismos se organizam em camadas celulares embebidos em uma matriz de polissacarídeos extracelular que atua na proteção dessa comunidade microbiana. Estudos microscópicos demonstram que no biofilme formado nos dentes naturais estão presentes algumas espécies bacterianas associadas a doenças sistêmicas, com predominância de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp e *Actinomyces* spp) (Chau et al., 1995; Monsenego, 2000). A remoção mecânica, boa higiene oral e utilização de agentes antimicrobianos são as formas mais comuns de prevenção e tratamento da cárie e doença periodontal. Entretanto, o acesso limitado de agentes tópicos para a placa e o desenvolvimento de resistência antibiótica criou a necessidade de estratégias alternativas para o controle da placa e para tratamento da gengivite e doença periodontal (Konopka & Goslinski, 2007).

Adicionalmente, o *Staphylococcus aureus* coloniza as vias nasais em 30-40 % da população. A maioria desses microorganismos é inofensiva, mas pode penetrar no corpo através de alguma lesão e causar infecções severas (Baron, 1996). Atualmente, o *S. aureus* resistente a antibióticos é considerado uma das mais temidas causas de infecções hospitalares (Baron, 1996; Livermore D M, 2000). Esses microorganismos têm importante papel na infecção de feridas causadas por queimaduras, podendo levar o paciente à morte.

Recentemente, o surgimento de cepas antibiótico-resistentes estimulou a pesquisa por tratamentos alternativos para doenças infecciosas. A Terapia Fotodinâmica (PDT) tem apresentado potencial para tratamento de infecções localizadas de pele e da cavidade oral (Konopka & Goslinski, 2007). Uma importante vantagem relacionada à utilização da PDT para o tratamento de infecções deve-se a possibilidade de inativação de cepas resistentes aos tratamentos convencionais. Além disso, parece ser improvável que os microrganismos desenvolvam resistência a PDT, já que esta envolve a formação de radicais livres oxidativos não-específicos (Dahl et. al., 1989).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E OBJETIVOS

2.1 Fundamentação Teórica

O processo fotodinâmico requer a utilização de um composto químico denominado fotossensibilizador (FS), a aplicação de uma luz que seja correspondente à banda de absorção do FS, e a presença de oxigênio. Lambrechts et al. (2005) avaliou a efetividade de uma porfirina catiônica (TriP[4]) associada a luz halógena sobre *S. aureus* e observou que os microrganismos foram sensíveis ao tratamento. Estudos também demonstraram inativação de patógenos utilizando luz de fotopolimerizador e LED (diodos emissores de luz) associados a FSs. Já foi demonstrado que

a utilização tanto do laser de He-Ne quanto do LED associados ao azul de toluidina obteve efetividade semelhante na inativação de biofilmes de *Streptococcus mutans*. Recentemente, Gois et al. (2009) utilizaram um fotossensibilizador derivado da hematoporfirina (Photogem[®]) em concentrações a partir de 25 mg/L associada a iluminação do tipo LED para a completa inativação de suspensões celulares de *S. aureus*.

De acordo com os aspectos citados, a PDT parece ser um método promissor para a inativação de microrganismos patogênicos. Essa terapia poderia suprir as dificuldades encontradas com as terapias, como a resistência antibacteriana. Atualmente, existem novos FS disponíveis que, se efetivos, poderiam auxiliar na difusão da PDT como modalidade terapêutica para o tratamento de infecções bucais. A curcumina é um composto de coloração amarela extraída do rizoma da planta *Curcuma longa* L (açafrão) que vem sendo investigado na PDT anti-câncer. Tem sido sugerido que a Curcumina possui efeitos antimicrobianos, antiinflamatórios e imunomoduladores, que poderiam ser exacerbados com a sua iluminação em comprimento de onda adequado (Dahl et. al., 1989). Não existem na literatura informações disponíveis sobre a PDT associando a Curcumina ao LED na inativação de *S. aureus*. Dessa forma, este estudo propõe-se a avaliar a utilização da PDT como método para inativação de *S. aureus* por meio da associação do FS Curcumina à fonte de luz do tipo LED.

2.2 Objetivos

Este estudo avaliou in vitro a atividade fotodinâmica da Curcumina associada a um LED (~455nm) sobre células de *S. aureus*, em função de:

- seis concentrações do agente FS Curcumina;
- três doses de luz LED no comprimento de onda azul.

3. METODOLOGIA

Para a avaliação da Terapia Fotodinâmica sobre *S. aureus*, foram utilizadas suspensões celulares (10^6 células/mL - escala McFarland) de uma cepa padrão (ATCC 25923) desse microrganismo.

Para fotossensibilização das amostras foram utilizadas soluções de Curcumina (Fluka Co.) solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%. A fonte de luz empregada foi uma mesa difusora de iluminação, composta por LEDs azuis, titulada “Bio Table” (idealizada e desenvolvida no Instituto de Física da Universidade de São Paulo – campus de São Carlos). A potência de saída do aparelho (22 mW/cm^2) juntamente com o tempo de iluminação (29, 20 e 14 minutos), determinou a quantidade de energia aplicada na amostra irradiada (37,5; 25,5 e 18,0 J/cm²).

A susceptibilidade das suspensões celulares de *S. aureus* a PDT, foi avaliada por meio da exposição a seis concentrações da Curcumina (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 20 •M) e três doses de luz (37,5; 25,5 e 18,0 J/cm²) no comprimento de onda azul (~455 nm). Assim, foram testadas 18 condições experimentais, obtidas pelo cruzamento das seis concentrações de FS e três doses de luz. Essas condições experimentais foram denominadas de P+L+. Adicionalmente, o efeito da aplicação isolada de cada concentração da Curcumina (P+L-) e de cada dose de luz (P-L+) também foi avaliado. Ainda, amostras adicionais referentes ao grupo controle não foram fotossensibilizadas com Curcumina nem iluminadas com o LED (P-L-), totalizando 28 condições experimentais.

Para todas as condições avaliadas, foram obtidas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} a partir das amostras, que foram semeadas em placas de Petri contendo o meio de cultura Mannitol Salt Agar. Após 48 horas de incubação a 37°C, as placas de Petri foram submetidas à contagem de colônias e os números de unidades formadoras de colônias (ufc/mL) foram calculados. Para cada condição avaliada neste estudo, foram realizadas cinco repetições. O plaqueamento das amostras foi realizado em duplicata para uma melhor caracterização do valor obtido.

Em algumas situações, os valores de ufc/mL obtidos foram extremamente elevados e, por isso, considerados de difícil avaliação. Dessa forma, as contagens de microrganismos, em ufc/mL, foram transformadas em logaritmo na base 10 para uma melhor compreensão dos resultados e

também para possibilitar a análise pretendida neste trabalho. Foi empregada a análise de variância (ANOVA) a dois fatores (concentração de FS e dose de luz) para a avaliação dos valores obtidos nas condições P+L+, P-L-, P+L- e P-L+. Nessa análise foram excluídas as condições experimentais que resultaram em nenhum crescimento bacteriano, já que nesses casos foi constatada a inativação total do microrganismo e os valores nulos impossibilitariam a inferência estatística. Em todos os casos, quando a ANOVA apontou a existência de diferença estatisticamente significativa, o teste complementar de Tukey foi empregado. Adotou-se o nível de 5% de significância como regra de decisão para aceitar como significativa uma diferença entre as médias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As médias e os desvios-padrão dos valores de ufc/mL obtidos em todas as condições experimentais avaliadas estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Médias e desvios-padrão dos valores de logaritmo de ufc/mL obtidos em todas as condições experimentais avaliadas.

Doses de luz (J/cm²)	Concentrações de Curcumina (•M)						
	0	0,1	0,5	1	5	10	20
0	6,76 ^{A a}	6,73 ^{A a}	6,79 ^{A a}	6,76 ^{A a}	0,00 [*]	0,00 [*]	0,00 [*]
	0,04	0,03	0,06	0,04	0,00	0,00	0,00
18	6,76 ^{A a}	5,68 ^{B b}	4,32 ^{B c}	2,35 ^{B d}	0,00 [*]	0,00 [*]	0,00 [*]
	0,05	0,05	0,04	0,12	0,00	0,00	0,00
25,5	6,75 ^{A a}	4,67 ^{C b}	4,16 ^{C c}	1,69 ^{C d}	0,00 [*]	0,00 [*]	0,00 [*]
	0,03	0,28	0,08	0,27	0,00	0,00	0,00
37,5	6,78 ^{A a}	4,51 ^{C b}	4,14 ^{C c}	1,88 ^{C d}	0,00 [*]	0,00 [*]	0,00 [*]
	0,05	0,03	0,03	0,34	0,00	0,00	0,00

Na vertical, letras maiúsculas iguais correspondem a valores estatisticamente semelhantes ($\alpha=0,05$);

Na horizontal, letras minúsculas iguais correspondem a valores estatisticamente semelhantes ($\alpha=0,05$);

* Não avaliado por meio de inferência estatística.

Para as três doses de luz aplicadas, a PDT resultou na completa inviabilização de *S. aureus* após a fotossensibilização com 5, 10 e 20 •M de Curcumina. Esse resultado foi aceito quando nenhuma colônia viável foi observada nas placas de Petri após incubação a 37°C durante 48 horas (Figura 1A). Esses achados estão de acordo com os obtidos por Góis et al. (2009) que também observaram a inativação total de *S. aureus* quando utilizaram um derivado de hematoporfirina como FS associado a um LED.

Nas condições experimentais em que foram avaliadas as concentrações 0,1; 0,5 e 1 •M de Curcumina foi observada uma redução significativa de crescimento bacteriano, em relação ao grupo controle (P-L-). A redução na viabilidade celular foi dependente da concentração de Curcumina e dose de luz utilizada. A utilização das concentrações de 0,1; 0,5 e 1 •M de Curcumina resultou em valores de ufc/mL significativamente inferiores ao grupo controle e diferentes entre si, sendo que a maior taxa de redução foi observada após fotossensibilização com 1 •M. Para cada concentração avaliada, o aumento na dose de luz de 18 para 25,5 J/cm² promoveu maior redução de viabilidade microbiana, enquanto que as doses de 25,5 e 37,5 J/cm² resultaram em valores semelhantes de ufc/mL entre si, independentemente da concentração de FS. O efeito fototóxico da curcumina sobre *S. aureus* também foi investigado por Dahl et al. (1989) Esses autores observaram que o mecanismo de inativação celular pode envolver a formação de peróxido de hidrogênio durante a iluminação e que a presença de oxigênio é fundamental para a ocorrência do processo fotodinâmico.

No grupo controle (P-L-) foi observado abundante crescimento de colônias viáveis nas placas de Petri após 48 h a 37°C (Figura 1B). Além disso, a ANOVA ($\alpha=0,05$), comprovou que a utilização isolada da Curcumina (P+L-) ou da luz (P-L+) não alterou significativamente o número de ufc/mL, em comparação com os valores obtidos no grupo controle.

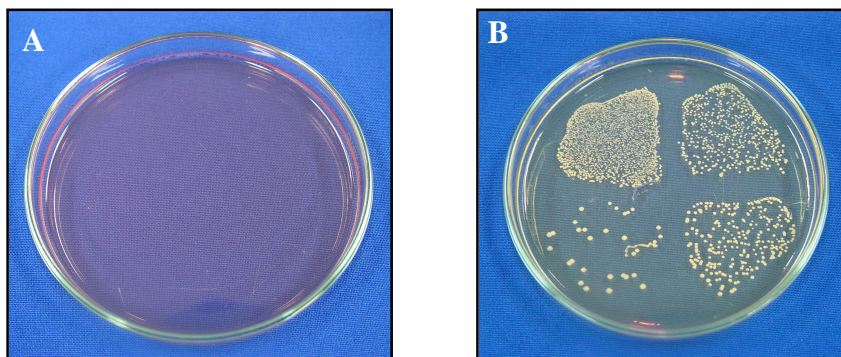


Figura 1- Placas de Petri referentes à completa inviabilização do microrganismo (A) e ao crescimento abundante de colônias (B).

5.CONCLUSÕES

Com base nas condições experimentais do presente estudo, foi possível concluir que:

- A completa inviabilização das suspensões celulares de *S. aureus* ocorreu com a utilização de todas as doses de luz, associadas a 5, 10 e 20 • M de Curcumina.
- A utilização de baixas concentrações de Curcumina resultou na redução significativa da viabilidade do microrganismo, sendo essa redução dependente da concentração avaliada.
- A utilização isolada de luz do tipo LED ou de Curcumina não demonstrou efeito tóxico sobre as suspensões celulares de *S. aureus*.

Referências Bibliográficas

- BARON, S. *Staphylococcus*. In: PEAKE, R. C. et al. (Eds.). **Medica Microbiology**. Galveston: The University of Texas Medical Branch, 1996.
- CHAU, V. B. et al. In-depth disinfection of acrylic resins. **J Prosthet Dent**, v. 74, n. 3, p. 309-13, Sep. 1995.
- DAHL, T. A. et al. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. **Arch Microbiol**, v. 151, n. 2, p. 183- 185, 1989.
- GOIS, M. M. et al. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to porphyrin-mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy: an in vitro study. **Lasers Med Sci**. 2009. No prelo
- KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **J Dent Res**, v. 86, n. 8, p. 694-707, Aug. 2007.
- LAMBRECHTS, S. A. et al. Effect of albumin on the photodynamic inactivation of microorganisms by a cationic porphyrin. **J Photochem Photobiol B**, v. 79, n. 1, p. 51-57, Apr. 2005.
- LIVERMORE, D. M. Antibiotic resistance in staphylococci. **Int J Antimicrob Agents**, v. 16, n. 1, p. S3-10, Nov. 2000.
- MONSENEGO, P. Presence of microorganisms on the fitting denture complete surface: study 'in vivo'. **J Oral Rehabil**, v. 27, n. 8, p. 708-13, Aug. 2000.