

Azul de Metileno, Verde de Malaquita, Indocianina Verde e Verterporfirina: ação fotodinâmica antimicrobiana sobre *Escherichia coli*.

Prates, R. A.^a; Suzuki, L. C.^a; Yamada Jr, A. M.^a; Ribeiro, M. S.^a

^aCentro de Lasers e Aplicações - IPEN - CNEN

Introdução:

A terapia fotodinâmica tem sido utilizada nas áreas da Saúde para a destruição seletiva de tumores e redução microbiana. Esta terapia consiste na associação de uma fonte de luz em baixa intensidade e um fotossensibilizador. A morte celular ocorre quando o fotossensibilizador absorve a energia luminosa, levando-o a produzir espécies reativas de oxigênio, que causam danos ao microorganismo ou célula alvo. Ela apresenta um espectro de atuação sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas¹⁻⁵, bem como em células eucariontes, como fungos^{6,7} e células neoplásicas^{8,9}.

O uso indiscriminado de agentes antimicrobianos promove a seleção natural de cepas microbianas resistentes e deixa uma oportunidade para recombinação genética dos fatores de resistência e mutação. Isso pode ser interpretado como um dos maiores problemas para o século XXI, visto que a capacidade de adaptação destes seres é gigantesca e para cada medicamento colocado no mercado, em pouco tempo, surge uma cepa resistente¹⁰. Muitos patógenos humanos tornaram-se multi-resistentes às drogas antimicrobianas e infecções com tais microorganismos são de difícil tratamento. Há, portanto, a necessidade de pesquisas por novos métodos antimicrobianos.

O objetivo deste trabalho foi comparar a ação fotodinâmica dos corantes Verterporfirina (VP), Indocianina Verde (IV), Verde de Malaquita (VM), dois tipos de Azul de Metileno (AM) um comercializado em farmácias de manipulação no Brasil e outro pela marca Sigma, na PDT antimicrobiana em *Escherichia coli*, observando sua eficácia em matar bactérias quando associando à irradiação *laser* em comprimentos de onda ressonantes a cada corante.

Materiais e Métodos:

Foram utilizadas *E. coli* do estoque do Centro de Lasers e Aplicações - IPEN/CNEN, crescidas em placas de Petri contendo agar de tripticaseína de soja (TSA) e incubadas a 37°C por 48h. Para padronização e quantificação do inóculo foi utilizado um espectrofotômetro. A massa de células foi colhida do meio de cultura e ressuspensa em tubos contendo 5 mL de PBS estéril com pH em 7,2. Após a homogeneização em vórtex, a transmitância foi aferida em espectrofotômetro a 520nm, e ajustada

para 61 a 61,5%, resultando em uma concentração de aproximadamente $1,0 \times 10^7$ ufc/mL.

Para realização do experimento, cada inóculo foi dividido em 4 tubos, sob as seguintes especificações: Grupo controle sem *laser* e sem corante (L-C-); Somente irradiado com *laser* $\lambda=660\text{nm}$, $P=100\text{mW}$ (Ecco Fibras, Campinas, Brasil); $\lambda=685\text{nm}$, $P=40\text{mW}$ (Quasar, Dentoflex, São Paulo, Brasil); e $\lambda=830\text{nm}$, $P=150\text{mW}$ (Quasar, Dentoflex, São Paulo, Brasil), sem o corante (L+C-); fotossensibilizador em concentração final de $100\mu\text{M}$ por 5 min. (L-C+) e finalmente PDT com os comprimentos de onda adequados a cada corante; $\lambda=660\text{nm}$ no VM e nos dois AM, $\lambda=685\text{nm}$ na VP e $\lambda=830\text{nm}$ na IV, perfazendo a aplicação de uma dose de $9\text{J}/\text{cm}^2$ (L+C+).

As irradiações foram feitas nos tubos de ensaio em contato com a base do tubo. Após este procedimento, todas as amostras foram colhidas, diluídas, plaqueadas em TSA, e encubadas a 37°C por 12 h.

Os dados obtidos foram convertidos em ufc/mL e submetidos à análise estatística teste-t com nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão:

Os melhores resultados em redução microbiana foram observados nos grupos que utilizaram o azul de metileno como fotossensibilizador, porém houve uma diferença entre os dois tipos comercializados havendo um melhor resultado no corante Sigma. O verde de malaquita apresentou baixa eficiência contra *E. coli* mostrando uma redução inferior a $1 \log_{10}$ (fig 1). Apesar da IV ter um alto rendimento quântico no estado tripleto¹¹, não foi observado nenhuma redução bacteriana. Também a VP, que é amplamente utilizada na área da oftalmologia, não se mostrou eficaz na redução desse microorganismo.

Em contrapartida, o corante verde de malaquita apresenta um rendimento quântico muito baixo para estado tripleto, principalmente quando ligado a material biológico¹². Mesmo nestas condições desfavoráveis, ele apresentou um comportamento antimicrobiano contra *E. coli*. O mesmo efeito foi observado em *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, outro microorganismo Gram negativo previamente estudado¹⁰.

Foi observada uma redução bacteriana de até 99,85% no grupo PDT AM Sigma; 96,58% no grupo

11840

PDT AM comercial; 89,74% no grupo PDT VM; 26,32% no grupo PDT IV; e 24,14% no grupo PDT VP, como mostrado na fig. 2.

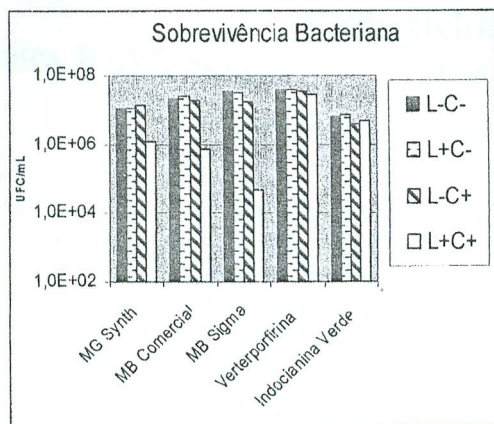


Figura 1

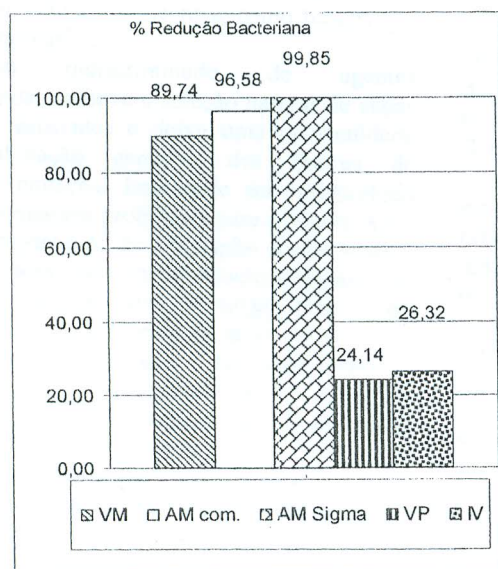


Figura 2

Conclusões:

Concluímos que os melhores resultados antimicrobianos foram com o azul de metileno das duas marcas testadas e seguidas pelo verde de malaquita, este, porém não produziu efeitos satisfatórios contra a *Escherichia coli*. Os corantes indocianina verde e verterporfirina não apresentaram nenhuma ação antimicrobiana sobre este microorganismo nos parâmetros estudados.

Agradecimentos:

Agradecemos pelo suporte financeiro à FAPESP (nº.05/01756-5), CNPq (nº.141508/2006-0) e CAPES.

Autor apresentador: Renato Araújo Prates
Centro de Lasers e Aplicações – IPEN-CNEN/SP
Avenida Lineu Prestes 2242
Cidade Universitária São Paulo-SP.
Telefone 0055 11 3816-9025 r. 217
e-mail – pratesra@yahoo.com.br

Referências:

- P. S. Golding, T. A. King, L. Maddocks, D. B. Drucker and A. S. Blinkhorn, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 47, 202-210 (1998)
- A. Pfitzner, B. W. Sigusch, V. Albrecht and E. Glockmann, *J Periodontol*, 75, 1343-9 (2004)
- Y. Chan and C. H. Lai, *Lasers Med Sci*, 18, 51-5 (2003)
- C. E. Millson, M. Wilson, A. J. MacRobert and S. G. Bown, *J Photochem Photobiol B*, 32, 59-65 (1996)
- T. N. Demidova and M. R. Hamblin, *Int J Immunopathol Pharmacol*, 17, 245-54 (2004)
- S. A. Lambrechts, M. C. Aalders and J. Van Marle, *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 2026-34 (2005)
- J. M. Bliss, C. E. Bigelow, T. H. Foster and C. G. Haidaris, *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 2000-6 (2004)
- Y. N. Konan, R. Gurny and E. Allemann, *J Photochem Photobiol B*, 66, 89-106 (2002)
- R. Ackroyd, C. Kelty, N. Brown and M. Reed, *Photochem Photobiol*, 74, 656-69 (2001)
- R. A. Prates, A. M. Yamada, Jr., L. C. Suzuki, M. C. Eiko Hashimoto, S. Cai, S. Gouw-Soares, L. Gomes and M. S. Ribeiro, *J Photochem Photobiol B*, 86, 70-76 (2007)
- S. Reindl, A. Penzkofer, S. H. Gong, M. Landthaler, R. M. Szeimies, C. Abels and W. Baumler, *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry*, 105, 65-68 (1997)
- M. S. Baptista and G. L. Indig, *Journal of Physical Chemistry B*, 102, 4678-4688 (1998)