

Avaliação da função do solvente na eficiência fotodinâmica antimicrobiana do azul de metileno.

Núñez, S.C.^a; Garcez, A.S.^a; Junqueira, H.^b; Baptista, M.S.^b e Ribeiro, M.S.^a

^a Centro de Lasers e Aplicações, IPEN/CNEN; ^b Instituto de Química, USP/SP

Introdução

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFA) tem sido extensamente estudada nos últimos anos e uma quantidade substancial de evidências científicas sustentam sua efetividade contra amplo espectro de microorganismos incluindo bactérias, fungos e vírus^{1,2,3}. Porém, apesar de todas as evidências poucos estudos clínicos ou orientados para a aplicação clínica estão disponíveis na literatura científica. Alguns fotossensibilizadores utilizados para TFA são bastante conhecidos como por exemplo o azul de metileno (AM), que é utilizado para uma série de finalidades na área médica. A grande variedade nos parâmetros utilizados nos estudos realizados *in vitro*, torna difícil a seleção de condições favoráveis para o desenho de um estudo clínico. O solvente utilizado para o fotossensibilizador, pode ser um parâmetro de importância na fotoquímica do corante⁴. Os solventes utilizados com maior frequência em TFA são água (deionizada ou destilada), solução salina 0,9% e 0,45% e solução salina tamponada com fosfato. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi analisar a função do solvente utilizado, mantendo-se a mesma concentração de fotossensibilizador. Para este estudo a água deionizada e a solução salina 0,9% foram selecionadas. Foram analisadas as alterações ópticas do corante em relação ao solvente. A eficiência fotodinâmica do AM foi testada fotoquimicamente através da eficiência para produção de oxigênio singleto e microbiologicamente para a redução de *Escherichia coli in vitro*.

Materiais e Métodos

Os solventes selecionados foram analisados em relação à presença de oxigênio molecular dissolvido através de sonda medidora de oxigênio. Os resultados obtidos foram comparados através de teste estatístico (*t* Student) sendo $p < 0,05$ o nível de significância aceito. As avaliações da absorção, fluorescência e a produção de oxigênio singleto foram realizadas em soluções contendo 30 μM de AM dissolvido em D_2O e em solução salina 0,9% preparada com D_2O . Os espectros de absorção de cada solução foram registrados em espectrômetro de absorção óptica e em seguida os espectros de

fluorescência foram obtidos. As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1cm e analisadas utilizando-se software apropriado. Para a medida de emissão no infravermelho do oxigênio singleto foi utilizado laser de Nd:YAG dobrado para excitação da amostra em 532nm. O espectro de emissão do oxigênio singleto em 1270nm foi obtido para cada solvente. Os estudos microbiológicos foram realizados com culturas de *E. coli* em fase estacionária de crescimento, com amostras contendo aproximadamente 10^8 células/mL, obtidas após 48h de crescimento em solução contendo caldo BHI (*Brain and Heart Infusion*) a 37°C. Um mL da solução bacteriana foi centrifugado a 3000rpm durante 10 min. As células foram suspensas em 1mL de água deionizada ou 1 mL de solução salina de acordo com os grupos estudados. Em placa de 96 poços foram colocadas alíquotas de 100 μL de AM a 60 μM dissolvido em salina 0,9% ou água deionizada de acordo com o grupo estudado e foram acrescidos 100 μL de suspensão bacteriana nos respectivos solventes para obtermos uma concentração final de AM de 30 μM . As amostras foram divididas nos seguintes grupos: Grupo Controle Ambiental (GCA) 100 μL de suspensão bacteriana e 100 μL de solvente foram colocados em um dos poços e permaneceram em repouso durante todo o experimento para obtenção da redução microbiana promovida pelo procedimento experimental; Grupo Tempo de Pré-Irradiação (GTPI) neste grupo 100 μL de suspensão bacteriana e 100 μL de solução de AM em cada solvente testado foram mantidos por 3 minutos no escuro para obtenção da toxicidade intrínseca do AM; Grupo Tratamento Solução Salina (GTSS) 100 μL de suspensão bacteriana e 100 μL de solução de AM dissolvido em solução salina foram irradiados diretamente nos poços com laser de diodo $\lambda = 660\text{nm}$ mantendo-se a potência constante de 40mW com tempo de exposição de 2min; Grupo Tratamento Água (GTA) este grupo recebeu o mesmo tratamento do GTSS com a variação apenas do solvente. Após cada tratamento proposto 10 μL da solução contendo microorganismos foram removidos e diluídos em 90 μL de solução salina tamponada com fosfato até a diluição de 10^6 . Dez μL de cada

11838

diluição foram retirados e colocados em placas contendo BHI e incubadas em estufa de crescimento à 37°C por 12 horas, quando foi realizada a contagem de ufc (unidades formadoras de colônias)/mL. Os resultados foram analisados estatisticamente sendo que, a contagem inicial de bactérias considerada foi à quantidade sobrevivente obtida, após contagem do GCA.

Resultados e Discussão

A água deionizada apresentou quantidade de O₂ dissolvido significativamente maior do que a solução salina 0,9%. A figura 1 apresenta o resultado das análises espectroscópicas.

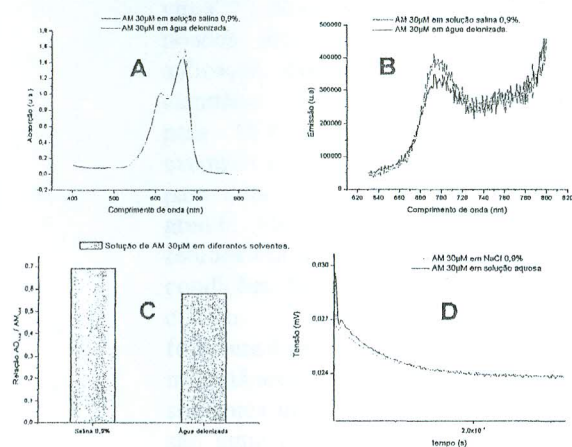


Figura 1. A espectro de absorção do AM a 30μM em solução salina e em solução aquosa. B espectro de emissão das duas soluções de AM. C Razão dímero/ monômero das soluções, D emissão do oxigênio singleto em 1270nm.

As análises espectroscópicas de absorção e fluorescência demonstraram a tendência de dimerização do AM em solução salina (Fig 1-A). O pico de absorção máxima correspondente a monômeros em aproximadamente $\lambda=660\text{nm}$ sofre diminuição enquanto o pico de absorção de dímeros em aproximadamente $\lambda=610\text{nm}$ apresenta elevação modificando-se a relação de absorção de dímeros /absorção de monômeros (Fig 1-C). A dimerização foi confirmada pelo espectro de fluorescência (Fig 1-B) com diminuição da emissão fluorescente na presença de solução salina, resultado esperado uma vez que, o dímero do AM não é fluorescente⁵. A análise da emissão de oxigênio singleto demonstrou que em água há maior eficiência para produção desta molécula do que em solução salina 0,9% (Fig. 1-D). Os resultados das análises microbiológicas revelaram que a redução microbiana é significativamente maior quando a água é utilizada como solvente. Este dado

confirma a importância da reação do Tipo II (formação de oxigênio singleto) na fotoquímica do AM uma vez que, é conhecido que a fotoquímica do dímero difere da do monômero. A presença de maior quantidade de dímeros pode promover a alteração do tipo de reação obtida após a irradiação do AM, de tipicamente Tipo II, para reação do Tipo I (formação de outras espécies reativas de oxigênio)⁶.

Conclusões

Estes resultados indicam que o solvente altera as propriedades óticas, fotoquímicas e a eficiência fotodinâmica do fotossensibilizador *in vitro*, portanto, o solvente utilizado é um importante fator a ser considerado para o desenho de um estudo clínico.

Referências

- Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganism. *Lasers Surg and Med*, 2001 (29):165-173.
- de Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Koga-Ito CY, Munin E, Jorge AOC. Photosensitization of different Candida species by low power laser light. *J Photochem Photobiol B: Biol*; 2006(83):34-38.
- Wainwright M. Local treatment of viral disease using photodynamic therapy. *Int J Antimicrob Agents*; 2003(21):510-520.
- Oliveira CS, Branco KP, Baptista MS, Indig GL. Solvent and concentration effects on visible spectra of tri-para-dialkylamino-substituted triarylmethane dyes in liquid solution *Spectrochem Act A*; 2002(58):2971-2982.
- Tuite EM and Kelly JM, Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. *J Photochem Photobiol B: Biol*; 21:103-124, 1999.
- Severino D, Junqueira HC, Gugliotti M, Gabrielli DS, Baptista MS. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. *Photochem Photobiol*; 77:459-468, 2003.