

INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA EXPLORANDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA: UM ESTUDO COM *S. MUTANS* E *P. AERUGINOSA*

S. R. Sá*, L. S. A. Melo*, A. Baptista***, M. S. Ribeiro***, S. C. Núñez***, I. T. Kato***, R. G. Lima-Neto**, R. E. Araujo*

*Departamento de Eletrônica e Sistemas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

**Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

***Laboratório de Terapia Óptica, Centro de Lasers e Aplicações, IPEN-CNEN/SP, São Paulo, Brasil

e-mail: gi_212@hotmail.com

Resumo: A Terapia Fotodinâmica (TFD) baseia-se na administração tópica ou sistêmica de um corante fotossensibilizador (FS) seguida da irradiação com luz visível de comprimento de onda adequado. É conhecido que a presença de nanopartículas (NPs) metálicas próximas a FS, utilizados em TFD, pode induzir a uma maior produção de espécies reativas de oxigênio, que induzem a morte celular via necrose e/ou apoptose. Neste trabalho exploramos o efeito antimicrobiano da associação de NPs de prata e do fotossensibilizador Riboflavina na TFD em culturas de *Streptococcus mutans* e *Pseudomonas aeruginosa*. Foi verificado que o uso de NPs e Riboflavina foi eficiente na ação antimicrobiana em culturas de *S. mutans* e mostrou-se estatisticamente indiferente para os experimentos realizados com *P. aeruginosa*. Os resultados reforçam a viabilidade do uso de NPs metálicas em TFD e contribuem para melhor entendimento da técnica fotoquímica.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, Nanopartículas de Prata, Riboflavina, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Abstract: Photodynamic therapy (PDT) is based on topical or systemic administration of a photosensitizer dye (FS) followed by low dose irradiation with visible light. It is known that the presence of metallic NPs near FS used in PDT can induce a greater production of reactive oxygen species, thereby inducing cell death via necrosis and / or apoptosis. In this study we explored the antimicrobial effect of silver nanoparticles and riboflavin photosensitizer on *Streptococcus mutans* and *Pseudomonas aeruginosa* cultures. We observed that the use of NPs and Riboflavin succeed on the antimicrobial action on *S. mutans* cultures and it was inefficient in the experiments performed on *P. aeruginosa* cultures. The results reinforce the use of metallic NPs on PDT, and contribute to a better understanding of the photochemical technique.

Keywords: Photodynamic therapy, silver nanoparticles, riboflavin, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Introdução

Atualmente, pesquisas buscam por novas modalidades de tratamento antimicrobiano com menores possibilidades de efeitos colaterais para o paciente. Dessa forma, o desenvolvimento de materiais em escala nanométrica para aplicações biomédicas, tem despertado interesse devido às mudanças nas propriedades físicas quando suas dimensões são reduzidas a dimensões nanométricas [1]. Inúmeras aplicações são atribuídas a nanopartículas metálicas (NPs), em especial as nanopartículas de prata (NPs Ag), possibilitando novas perspectivas para o tratamento de infecções fúngicas, bacterianas e virais, que frequentemente adquirem resistência aos fármacos tradicionalmente administrados [2].

Quando NPs metálicas são irradiadas, geram uma oscilação coletiva dos elétrons do metal (ressonância localizada de plasmons), que induzem a uma alteração do campo elétrico próximo a nanoestrutura [3].

Esse fenômeno pode promover amplificação da fluorescência de agentes de contraste em técnicas de diagnóstico [4] e também permite o acompanhamento de processos dinâmicos de proteínas em técnicas de microscopia [5]. Também foi verificado que a presença de NPs metálicas próximas a fotossensibilizadores (FS), utilizadas em Terapia Fotodinâmica (TFD), podem induzir a uma maior produção de oxigênio singleto (1O_2), que é altamente citotóxico, e espécies reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio, superóxido e radicais hidroxila), induzindo assim a morte celular via necrose (por inviabilização direta do tecido ou por danos causados a sua vasculatura) e/ou apoptose (processo de morte celular programada) e melhorar o desempenho da técnica [6].

A TFD tem a vantagem de dupla seletividade: o FS pode ser direcionado às células ou ao local da infecção e o procedimento pode ser repetido várias vezes, se necessário, visto que não há efeitos tóxicos cumulativos e é usualmente não invasivo [7].

Micro-organismos tais como bactérias, fungos e vírus também podem ser mortos pela combinação de luz visível e FS, depois de tratados em um processo denominado Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa). Segundo [8], o efeito bactericida da TFDa pode

ser explicado por dois mecanismos: o primeiro refere-se aos danos causados sobre o DNA e o segundo é causado pela deterioração da membrana citoplasmática por espécies citotóxicas geradas pela TFDa, levando a eventos como a inativação do sistema de transporte da membrana, peroxidação e outros.

Neste trabalho visamos observar a ação antimicrobiana da TFD, devido a interação de NPs de prata e moléculas de Riboflavina em culturas de bactéria Gram-positiva *Streptococcus mutans* ATCC 25175, e outra Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Materiais e métodos

Síntese das Nanopartículas de Prata – As NPs Ag com pectina foram sintetizadas de acordo com o protocolo [9]. Para isso, 1 mL de uma solução de pectina (0.5%) e 3mL de uma solução de AgNO_3 (10^{-3} M) foram adicionadas sob agitação a 25 mL de água destilada. A solução foi aquecida até atingir a temperatura de 90°C e então 1 mL de solução de Citrato de sódio (0.1M) foi adicionada. O aquecimento a 90°C e a agitação foi mantido durante 30 minutos.

A morfologia das NPs Ag foi determinada a partir da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) Tecnai20. Os colóides também foram caracterizados utilizando um espectrômetro UV-visível (UV-3150/3101; SHIMADZU).

Riboflavina – O agente fotossensibilizador usado na pesquisa foi a riboflavina (Rb), composto orgânico que faz parte do complexo vitamínico B2. Aqui foram utilizadas soluções aquosas de riboflavina com concentração de 157 μM .

LED – Para o experimento foi utilizado um LED $\lambda=455\pm 20\text{nm}$ (MMOptics, São Carlos, Brasil) com densidade de potência de 90mW/cm².

Micro-organismos – Foram avaliados 2 tipos de bactérias: uma Gram-positiva (*Streptococcus mutans*, ATCC 25175) e uma Gram-negativa (*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853).

Os inóculos de *P. aeruginosa* foram cultivados e estocados em TSA (Tryptic Soy Agar), em presença de O₂, a 37°C, por 24 horas. *S. mutans* cresceram em meio anaeróbio, em BHI (Brain Heart Infusion) a 37°C por 2 dias.

Teste em cultura dos biocolóides – Na avaliação da ação dos biocolóides (NPs Ag – Rb) foram classificadas em 12 grupos, de acordo com o tratamento que receberam (Tabela 1).

No grupo controle, 350 μL da suspensão do micro-organismo em PBS e 150 μL de água destilada estéril foram depositados em tubos Eppendorf totalizando um volume final de 500 μL , que posteriormente foram levados ao vortex e agitados. Depois de agitada a suspensão ficou em repouso por um período de 10 minutos (Tempo adotado para todas as amostras). Após os 10 minutos a suspensão foi levada novamente ao vortex e agitada. Em seguida uma alíquota de 20 μL foi adicionada ao poço A-1 marcado em uma placa de

microtitulação na qual foi realizada uma diluição seriada. Para isso cada poço a partir do -1 já continha 180 μL de PBS de forma que ao final da diluição o volume final do poço foi de 200 μL e com concentração final de 10^{-5} .

Tabela 1: Grupos utilizados para avaliação da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana frente bactérias Gram-positiva e Gram-negativa

GRUPOS	TRATAMENTOS
Grupo 1 - Controle	Não foi submetido a nenhum tratamento
Grupo 2 – LED	Amostras irradiadas por 10 minutos, sem AgNPs ou Riboflavina.
Grupo 3 – Ag	Apenas Ag NPs foi adicionada aos micro-organismos.
Grupo 4 - Ag + LED	Ag NPs e irradiação com LED por 10 minutos.
Grupo 5 - Rb	Apenas riboflavina foi adicionada aos micro-organismos.
Grupo 6 - Rb + LED 10 minutos	Depois da adição da riboflavina, a amostra foi irradiada por 10 minutos.
Grupo 7 – Rb + NPs Ag	Foram adicionadas riboflavina e NPs Ag aos micro-organismos sem irradiação.
Grupo 8 – NPs Ag + Rb + LED 2 minutos	Foram adicionadas riboflavina e NPs Ag aos micro-organismos, em seguida amostras foram irradiadas com LED por 2 minutos.
Grupo 9 - NPs Ag + Rb + LED 4 minutos	Foram adicionadas riboflavina e NPs Ag aos micro-organismos, em seguida amostras foram irradiadas com LED por 4 minutos.
Grupo 10 - NPs Ag + Rb + LED 6 minutos	Foram adicionadas riboflavina e NPs Ag aos micro-organismos, em seguida amostras foram irradiadas com LED por 6 minutos.
Grupo 11 - NPs Ag + Rb + LED 8 minutos	Foram adicionadas riboflavina e NPs Ag aos micro-organismos, em seguida amostras foram irradiadas com LED por 8 minutos.
Grupo 12 - NPs Ag + Rb + LED 10 minutos	Foram adicionadas riboflavina e NPs Ag aos micro-organismos, em seguida amostras foram irradiadas com LED por 10 minutos.

O grupo que recebeu o biocolóide Rb ou Ag, 350 μL da suspensão do micro-organismo em PBS foi alíquotado e 150 μL do biocolóide foi adicionado em tubo Eppendorf chegando a um volume final de 500 μL , ficando em repouso por 10 minutos. Após o final do

tempo pré-estabelecido, foi levado novamente ao vortex e agitado. Dessa suspensão 20 μL foi alíquotado e adicionado a placa de microtitulação para posterior diluição seriada. Na placa de microtitulação cada poço já continha previamente 180 μL de PBS. Sendo assim, o volume final foi de 200 μL e com concentração final de 10^{-5} .

Nos grupos 8, 9, 10, 11 e 12 inicialmente 350 μL da suspensão do micro-organismo suspenso em PBS e 150 μL do sistema (Ag, Rb, Ag+Rb), foram depositados em tubo Eppendorf chegando a um volume final de 500 μL e levados ao vortex e agitado. Depois de agitada em vortex, essa suspensão ficou em repouso por um período de 10 minutos para todas as amostras. Ao final desse período, a amostra foi novamente agitada em vortex e uma alíquota de 150 μL foi retirada e colocada em um poço da placa de microtitulação e então foram irradiados com LED com $\lambda=455\pm 20\text{nm}$ (MMOptics, São Carlos, Brasil) com taxa de fluência de $90\text{mW}/\text{cm}^2$ por um período de 2, 4, 6, 8 e 10 minutos.

Diluição seriada e plaqueamento – Após tratamento, uma alíquota de 20 μL dos micro-organismos foi retirada e feita diluição seriada. A diluição seriada ocorreu de 1:10, 1:100, $1:10^{-3}$, $1:10^{-4}$, $1:10^{-5}$. Ao final do processo, uma alíquota de 10 μL de cada grupo do poço foi retirada e dispensada em placa de petri (Meio TSH para *Pseudomonas aeruginosa* e BHI para *Streptococcus mutans*) com auxílio de uma micropipeta multicanal. Essas placas ficaram em repouso para que o meio absorvesse as amostras. Após este período as placas foram invertidas, para que a água de condensação formada na tampa da placa não entrasse em contato com o meio de cultura, sendo estas devidamente identificadas e condicionadas em locais específicos onde ficaram por 24h a 37°C .

Após 24h as placas foram então retiradas da incubação para a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) utilizando o contador de colônias.

Após a contagem das UFC, foi utilizado o teste estatístico ANOVA com teste de Turkey, e os resultados apresentados em gráficos.

Resultados e Discussão

Ao avaliar a fração de sobrevivência dos micro-organismos testados, presente nos gráficos da Figura 1 A e B, conclui-se que a PDT que associou a riboflavina (fotossensibilizador) com as NPs Ag foi eficiente nas culturas de *S. mutans*, usando o teste estatístico ANOVA com teste de Turkey. A significância foi aceita em $p<0,05$ (Figura 1 A), e mostrou-se estatisticamente indiferente para os experimentos realizados com *P. aeruginosa*, $p>0,05$ (Figura 1 B). Esse resultado comprova dados da literatura que relatam a maior suscetibilidade das Gram-positivas à PDT, mesmo quando o tratamento convencional foi intensificado com a presença das NPs Ag.

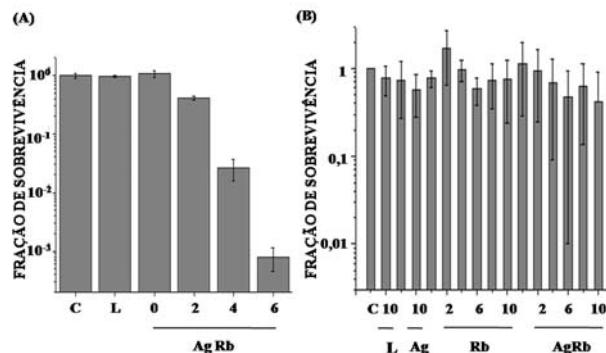


Figura 1 – Fração de sobrevivência do *S. mutans*, em A, e da *P. aeruginosa*, em B.

Para justificar os resultados obtidos a partir da análise dos gráficos da fração de sobrevivência, foi realizado um estudo que permitiu avaliar a quantidade e fotossensibilizador que penetrou na célula de cada tipo de bactéria estudada.

Os inóculos das duas bactérias avaliadas foram incubados com riboflavina e NPs Ag por 30 minutos, em seguida as células foram lavadas com PBS. Aliquotas de 1 mL, de cada amostra, foram centrifugadas e os precipitados suspensos em 1 mL de NaOH (0.1 M) e SDS (dodecil sulfato 12 poliacrilamida, 1%), por 24h. Em seguida, a absorbância foi medida e, conforme observado na Figura 2, a intensidade maior foi observada nas amostras que continham *S. mutans*, propondo que houve uma maior captação do sistema NPsAg – Riboflavina, usado para a PDT, por esse tipo de bactéria. Esse resultado reforça os estudos citados anteriormente que mostram uma susceptibilidade maior das Gram-positivas à técnica estudada.

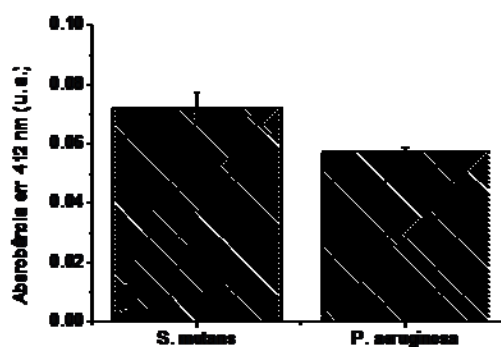


Figura 2: Resultado do espectro de absorção, em 412 nm, do sistema NPs Ag – riboflavina absorvido pelas células de *S. mutans* e *P. aeruginosa*.

Quando irradiadas, as NPs metálicas podem gerar um aumento do campo eletromagnético em região próxima as nanoestruturas. O aumento do campo induz uma melhor excitação das moléculas fotossensibilizadoras e consequentemente aumenta a produção de oxigênio singlete e espécies reativas de oxigênio no meio [3]. Alguns parâmetros são importantes nesse processo, como a separação espacial entre NPs e FS, e a sobreposição espectral da banda de plasmon e de absorção da molécula fotossensibilizadora.

Em solução, a distância entre os colóides é determinada pela concentração das nanoestruturas e das moléculas fotossensíveis, pela espessura da camada de pectina que envolve as NPs e também pela interação eletrostática molécula-NPs [9].

Essa interação entre o fotossensibilizador, luz e oxigênio, gera oxigênio singlete e espécies reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio, superóxido e radicais hidroxila), capazes de induzir a inviabilização de células e a morte de micro-organismos, como observado por Raab [9]. Isso é resultado da reação envolvida, que decorre da excitação eletrônica do corante pela luz em comprimento de onda adequado, seguidos de dois mecanismos principais de reação, a partir de seu estado excitado: transferência de elétrons (conhecido como mecanismo tipo 1) e transferência de energia (mecanismo tipo 2). O mecanismo o tipo 2 é o que ocorre com maior frequência, conferindo oxigênio singlete, sendo altamente citotóxico aos micro-organismos, levando a um processo de apoptose [8].

Com a crescente resistência dos micro-organismos aos antibióticos tradicionalmente empregados, é importante encontrar novas técnicas de tratamento que atuem por mecanismos de ações diferentes aos fármacos em uso. Nesse contexto, a TFDa tem sido proposta como uma terapia antimicrobiana alternativa, sendo efetiva contra bactérias, fungos e vírus [10].

Quanto a resistência no tratamento contra bactérias usando TFDa, é conhecido que bactérias Gram-positivas, são mais susceptíveis ao tratamento que bactérias Gram-negativas, isso pode ser em decorrência pelas diferenças estruturais da parede celular [11] [12].

A escolha do fotossensibilizador utilizado é essencial para um tratamento eficaz, pois é baseado na capacidade do mesmo em absorver luz em comprimento de onda específico ao LED. Por isso, novos fotossensibilizados estão sendo empregados, dentre eles a Rb, uma vitamina do complexo B2. Segundo a referência [9], quantificaram em 28,5% a amplificação na produção de oxigênio singlete, sendo um fotossensibilizador propenso no tratamento de infecções por micro-organismos.

Conclusão

A TFDa pode conferir tratamento a infecções contra micro-organismos que frequentemente adquirem resistência aos antibióticos tradicionalmente empregados tornando-se um método alternativo no tratamento dessas infecções. Os resultados apresentados estimulam o uso de NPs metálicas e Riboflavina sendo eficiente antimicrobiano em culturas de *S. mutans* e mostrou-se estatisticamente indiferente para *P. aeruginosa*.

Agradecimentos

Este trabalho teve o apoio financeiro da FACEPE e do CNPq. Os autores também agradecem o apoio do INCT de Fotônica.

Referências

- [1] Huang, T.; Xu, X. N. Synthesis and characterization of tunable rainbow colored colloidal silver nanoparticles using single-nanoparticle plasmonic microscopy and spectroscopy. *J Mater Chem*. 2010, 20, 9867.
- [2] Machado, A. E. H. Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Rev Quím Nova*. 2010, 23(2): 237-3.
- [3] Aslan, K.; Gryczynski, I.; Malicka, J.; Matveeva, E.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D. Metal-enhanced fluorescence: An emerging tool in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*. 2005, 16, 55.
- [4] Ray, K.; Badugu, R.; Lakowicz, J. R. Metal-enhanced fluorescence from CdTe nanocrystals: A single-molecule fluorescence study. *J Am Chem Soc*. 2006, 128, 8998.
- [5] Barud, H. S.; Assunção, R. M. N.; Martines, M. A. U.; Dexpert-Ghys, J.; Marques, R. F. C.; Messaddeq, Y.; Ribeiro, S. J. L. Bacterial cellulose-silica organic-inorganic hybrids. *J Sol-Gel Sci Technol*. 2008, 46, 363.
- [6] Zhang, Y.; Aslan, K.; Previte, M. J. R.; Gedds, C. D. Metal-enhanced singlet oxygen generation: a consequence of plasmon enhanced triplet yields. *J fluoresce*. 2007, 17, 345-9.
- [7] Perusssi, J. R. Inativação fotodinâmica de micro-organismos. *Rev Quim Nova*. 2007, 30(4): 988-4.
- [8] Takasaki, A. A.; Aoki, a.; Mizutani, K.; Schuwarz, F.; Sculean, a.; Wang, C. Y. et al. Application of antimicrobial photodynamic in periodontal and peri-implant diseases. *Pedodontol*. 2009, 51, 109-40.
- [9] Melo L. S. A.; Gomes, A. S. L.; Saska, S.; Nigoghossian, K. Y.; Messaddeq, R. S. J. L.; De Araujo, R. E. . Singlet Oxygen Generation Enhanced By Silver-Pectin Nanoparticles. *J Fluoresce*. 2012, 22, 230-35.
- [10] Souza, G. D.; Rodrigues, M. A.; Silva, P. P.; Guerra, W. Prata: Breve histórico, propriedades e aplicações. *Educ. Quím*. 2013, 24(1): 1-4.
- [11] Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation Antimicrob agents. *Chemother*. 2005, 49, 2329.