

AÇÃO ANTIMICROBIANA DA PDT NO COMBATE AO STAPHYLOCOCCUS AUREUS: UM ESTUDO COMPARATIVO ENTRE FOTOSSENSIBILIZANTES.

Müller F.¹, Oliveira V.C.², Oliveira A.L.³, Silva N.S.⁴

^{1,2,3,4}Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, IP&D
Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova – São José dos Campos, SP – Brasil
Cep: 12244-000 – Fone: (12) 3947 – 1125

derfmuller@hotmail.com, biovinciusco@ibest.com.br, lucros1@yahoo.com.br, nsoares@univap.br

Resumo: Estudos para encontrar uma terapia alternativa antimicrobiana a qual bactérias não serão capazes de desenvolver resistência têm sido desenvolvidos. Uma dessas terapias poderia ser através da combinação entre um corante não tóxico (fotosensibilizante) e luz visível, conhecida como terapia fotodinâmica (PDT). O objetivo desse estudo foi provocar morte bacteriana pela PDT. Para tal dispusemos de 2 fotosensibilizantes: azul de metileno (0.01% peso/volume) e alumínio fitalocianina tetrasulfonada (35 µM) estudados de forma comparativa. O laser de baixa potência de Arseneto de Gálio Alumínio (685 nm) foi escolhido como o agente ativador dos fotosensibilizantes. A bactéria utilizada foi o *Staphylococcus aureus*. Os resultados obtidos quanto a sobrevivência bacteriana foram: 53,78% para azul de metileno utilizado isoladamente, 97,25% para fitalocianina utilizada isoladamente, 103,1% para laser, 53,44% para laser mais azul de metileno e 23,42% para laser mais fitalocianina. Para isso tomamos com referência as colônias controle que totalizavam 100%. Os experimentos têm mostrado que a PDT tem boa funcionalidade como alternativa para uma terapia antibiótica tópica.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, APDT, alumínio fitalocianina tetrasulfonada, azul de metileno.

Introdução.

A resistência bacteriana frente à antibioticoterapia está conduzindo cada vez mais a elaboração de terapias antimicrobianas de interesse mundial (WISE et al., 1998). Muitas infecções são difíceis de se tratar e pacientes infectados por muito tempo requerem longa permanência hospitalar.

Como terapia alternativa pode ser citada a Terapia Fotodinâmica (PDT), a qual envolve a morte de microorganismos pela luz na presença de um agente fotosensibilizante. A excitação do fotosensibilizador se dá pela absorção de luz em um comprimento de onda apropriado e na presença de oxigênio, converte o fotosensibilizante para seu estado ativado, que por sua vez reage ou com um substrato local (reação tipo I) para formar radicais citotóxicos, ou com oxigênio molecular (reação tipo II) para produzir o oxigênio citotóxico singleto (MANYAK, 1990). Esse oxigênio reativo gerado resulta em morte celular.

A terapia fotodinâmica teria duas grandes vantagens sobre antisépticos e antimicrobianos convencionais: primeiro, como nenhum dos dois componentes do sistema (luz e fotosensibilizante) é inerentemente bactericida, o efeito antimicrobiano seria limitado para regiões luz-irradiadas em áreas fotosensibilizante-tratadas, evitando um desequilíbrio na microflora local com exceção daqueles que estão sendo alvejados;

segundo, e talvez mais importante, o desenvolvimento de resistência para fotoquímica induzindo morte à qual é mediada predominantemente por oxigênio singleto, seria improvável (WAINWRIGHT, 1998).

Neste estudo foi analisada a propriedade antimicrobiana da Terapia Fotodinâmica no combate ao *Staphylococcus aureus*. Estudos anteriores nos revelaram uma grande escala de corantes que podem ser utilizados como agente fotosensibilizante, mas apenas dois deles fizeram parte desse estudo: azul de metileno e fitalocianina (em especial a tetrasulfonada). O azul de metileno foi o primeiro corante a ser utilizado na terapia fotodinâmica e é o que possui mais referências na literatura. É um composto relativamente barato e de fácil aquisição. Já os derivados da fitalocianina, são compostos mais recentes que mostram um futuro promissor. Elas são fotosensibilizantes de segunda geração assim como as porfirinas. Sua intensa absorção na faixa do vermelho visível, e sua longa permanência no estado fatores atribuídos a elas (SMETANA et al., 1994). O laser utilizado foi o Arseneto de Gálio Alumínio com comprimento de onda de 685 nm. Este foi essencial para a escolha dos fotosensibilizantes por produzirem índices mais elevados de oxigênio singleto quando exposto a luz.

Material e métodos

Extrato bacteriano: O organismo utilizado nesta investigação foi o *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458). Para finalidades experimentais, algumas colônias foram inoculadas em 20 ml de meio BHI (Brain Heart Infusion- Difco®), colocadas dentro de uma estufa a 37° C para o crescimento das colônias em *over-night*, chegando a um crescimento log de $3,04 \times 10^6$ bact/ml de acordo com a leitura espectrofotométrica.

Laser e fotossensibilizantes: um laser de baixa potência de Arseneto de Gálio Alumínio (GaAlAs) foi o escolhido para este estudo, nos seguintes parâmetros: 30 mW de potência, 4,5 J/cm² de densidade de energia, 685 nm de comprimento de onda, 5 minutos de irradiação, a uma distância de 4 cm em uma área de 2 cm².

Os agentes fotossensibilizantes empregados foram: azul de metileno (Synth) numa proporção de 0.01% peso/volume (CHAN; LAI, 2003) e a alumínio ftalocianina tetrasulfonada (AIPcS₄) numa concentração de 35µM conforme observado, em experimentos prévios, como sendo uma concentração eficaz.

Fotossensibilização e irradiação: Aliquotas foram distribuídas em poços de uma placa contendo 24 poços na seguinte disposição para formar os respectivos grupos:

- Grupo 1 (controle)*: 1000 µl de cultura bacteriana;
- Grupo 2*: 965 µl bactéria + 50 µl de Triton X 100 – 1% + 35 µM AIPcS₄;
- Grupo 3*: 500 µl bactéria + 500 µl azul de metileno;
- Grupo 4**: 1000 µl de bactéria;
- Grupo 5**: 965 µl bactéria + 50 µl de Triton X 100 – 1% + 35 µM AIPcS₄;
- Grupo 6**: 500 µl bactéria + 500 µl azul de metileno.

*Grupos que não foram irradiados com laser;

**Grupos que receberam irradiação laser.

A cultura bacteriana após cultivo *over-night* para atingir a fase log de crescimento, foi repicada em alíquotas em uma placa de 24 poços distribuídos em triplicata para cada grupo em posições intercaladas. Nos poços onde seriam colocados os fotossensibilizantes, antes foi adicionado 50 µl de Triton X 100– 1% (SAIJONMAA-KOULUMIES; LLOYD, 2002) para tratar a membrana externa das bactérias e assim facilitar a penetração do fotossensibilizante, deixando incubar a 37° C no escuro por 1 hora. Após a incubação com os fotossensibilizantes, o conteúdo de cada poço foi transferido para eppendorfs individuais e centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos para remoção do agente fotossensibilizante não captado. Em seguida descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu o sedimento em 1 ml de PBS (salina 0,9 % estéril). O conteúdo de cada eppendorf foi então recolocado nos seus respectivos poços para

proceder a irradiação. Esta foi realizada no escuro com o laser diodo GaAlAs nos parâmetros já mencionados. Após a irradiação, foram retiradas alíquotas de 100 µl de cada poço e diluídas 2 vezes em PBS. Depois dessa diluição seriada foi colocado 100 µl na placa de Petri e distribuído uniformemente com o auxílio da alça de Drigalski. Ao final as placas de Petri foram colocadas dentro de uma estufa a 37° C por 24 horas para assim efetuar a leitura dos resultados.

Método de leitura dos resultados: transcorridas 24 horas as placas de Petri foram fotografadas com máquina digital DSC-W5 (Sony Cybershot), sendo transferidas para um computador convencional para proceder com a contagem das colônias formadas através do programa UTHSCSA ImageTool Versão 3.0 .

Resultados:

Frações de sobrevivência bacteriana foram expressas como frações de CFU, portanto foram obtidos valores CFU para: colônias controle, colônias contendo apenas azul de metileno, colônias contendo apenas AIPcS₄, colônias irradiadas com laser, colônias contendo azul de metileno e irradiadas com laser e colônias contendo AIPcS₄ irradiadas com laser, após completadas as 24 horas pós experimento.

Considerando que as colônias controle são um total de 100% (cerca de 3138 colônias em média), os valores de sobrevivência bacteriana foram indicados num processo comparativo com as colônias controle. O azul de metileno, na concentração usada, mostrou ser um fotossensibilizante que apresenta uma certa atividade antimicrobiana quando utilizado isoladamente, apresentando 54,01% de sobrevivência de bactérias (cerca de 1695 colônias em média). Já a AIPcS₄ manteve um número de CFU similar ao do controle, não apresentando assim atividade antimicrobiana quando usado isoladamente, com valor de 98,4% de sobrevivência bacteriana (cerca de 3088 colônias em média), como mostrado na Figura 1.

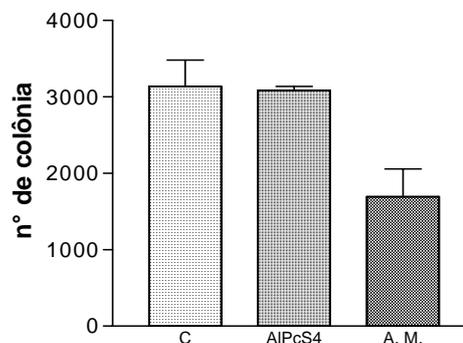


Figura 1- Efeitos propostos pelos fotossensibilizantes ftalocianina e azul de metileno

sobre colônias de *Staphylococcus aureus* em comparação com as colônias controle.

Ao contar as colônias irradiadas apenas com laser, foi observado que o mesmo não apresentou propriedade antimicrobiana, pelo contrário, ele apresentou atividade bio-estimulatória, e sua contagem chegou a um valor 3,1% acima do valor obtido no controle (cerca de 3237 colônias em média), como mostrado na Figura 2.

Quando partimos para a contagem das colônias que apresentavam azul de metileno e AIPcS₄ respectivamente e irradiadas com laser, foram observados valores de sobrevivência bacteriana menores quando comparados ao controle, mostrando os seguintes valores de sobrevivência bacteriana: 43,75% para azul de metileno mais laser (cerca de 1373 colônias em média) e 23,67% de sobrevivência bacteriana para AIPcS₄ mais laser (cerca de 744 colônias em média), Figura 2.

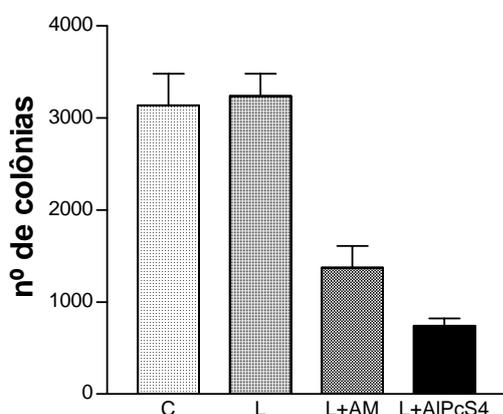


Figura 2- Efeitos propostos pelo laser (L), laser + azul de metileno (L+AM) e laser + ftalocianina (L+AIPcS₄) sobre *Staphylococcus aureus* em comparação com as colônias controle (C).

Ao comparar os valores de bactérias que foram tratadas apenas com fotossensibilizante e aquelas que, além de conterem o mesmo, também foram irradiadas, obteve-se os valores apontados na Figura 3.

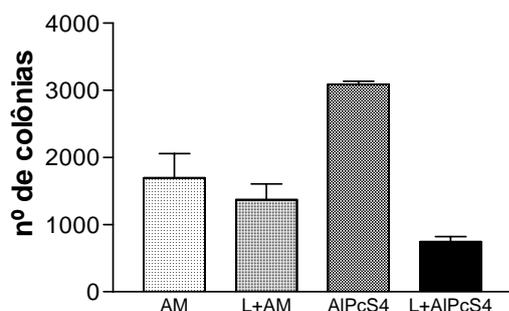


Figura 3- Efeitos comparativos entre azul de metileno (AM) e laser + azul de metileno (L+AM) e

entre ftalocianina (AIPcS₄) e laser + ftalocianina (L+AIPcS₄) na sobrevivência bacteriana.

Observando os valores da Figura 3, chegou-se a conclusão que o azul de metileno mais laser teve uma pequena variação, obtendo um valor de 81% de sobrevivência bacteriana, já AIPcS₄ possuiu uma variação bem considerável, com um valor 24,06% (cerca de 742 colônias em média) de sobrevivência, tendo como base a utilização isolada de cada fotossensibilizante como sendo 100%.

Discussão.

Estudos anteriores demonstraram que a PDT contra *Staphylococcus aureus* pode possuir uma variação considerável quando do fotossensibilizante usado. E foi estabelecido que, para organismos gram-positivos, tanto fotossensibilizantes carregados positivamente como os carregados negativamente são efetivos para mediar a PDT (SOUKOS et al., 1998).

Os resultados do presente estudo têm demonstrado uma significativa diferença quanto ao tipo de agente fotossensibilizante utilizado na PDT. De acordo com outros autores, o azul de metileno não é efetivo contra bactérias até que uma certa concentração inicial eficaz tenha sido descoberta (MILLSON et al., 1996). Isso vale também para a ftalocianina, pois trabalhos prévios não mostraram resultados significativos quando da utilização de concentrações diferentes da que foi usada nesse estudo.

Uma maior ou menor morte bacteriana é determinada pelas características de sua superfície quanto a penetração do agente fotossensibilizante e também pelas características hidrofóbicas do mesmo (DAS et al., 2001).

Um importante objetivo na investigação do processo de fotossensibilização na PDT é a elucidação do mecanismo de ação do agente fotossensibilizante selecionado, para determinar qual o tipo de reação ocorrida (tipo I ou tipo II). Neste estudo, a morte bacteriana foi mediada predominantemente pelo oxigênio singlete, portanto pela reação do tipo II, pois o oxigênio reativo previamente formado não reage com nenhum substrato local, sendo tal característica exclusiva da reação tipo I.

Estudos anteriores nos revelaram uma grande escala de corantes que podem ser usados como agente fotossensibilizante: ftalocianinas, porfirinas, azul de metileno, azul de toluidina, etc (BERTOLONI et al., 2000) e todos mostraram ter atividade contra bactérias gram positivas e contra gram negativas frente à irradiação (MERCHAT et al., 1996). Esta eficácia de morte bacteriana promovida por todos estes fotossensibilizantes tem sido confirmada como sendo significativamente diferente entre bactérias gram positivas e gram

negativas, com maior eficácia contra as bactérias gram positivas (MERCHAT et al., 2001). O meio fisiológico para diferenciar bactéria gram positiva de gram negativa é que a segunda tem uma membrana externa (bicamada lipídica) fora da camada de peptídeoglicano.

Existem evidências sugerindo que fotossensibilizantes que penetram no interior da bactéria pode ser mais efetivo que aquele que age na superfície bacteriana (HAMBLIN et al., 2002). Isto não quer dizer que os agentes fotossensibilizantes que agem na superfície bacteriana não são eficazes, como muitos trabalhos anteriores já mostraram (BHATTI ET AL., 1998).

Conclusão

Os experimentos têm mostrado que a PDT tem boa funcionalidade como alternativa para uma terapia antibiótica tópica, mas somente uma experimentação clínica controlada e minuciosa pode provar a eficácia da PDT para inativação de bactérias *In vivo*. Indicadores para essa nova fitalocianina mostram que ela teria uma boa eficácia para controlar a colonização bacteriana em funcionários e pacientes hospitalares, esterilizando feridas e desinfetando a pele e lesões da mesma, se for realçada a sua eficácia antimicrobiana contra bactérias *In vivo*, em comparação com sua eficácia contra bactérias eucariontes *In vitro*. Já com o azul de metileno é necessário ter cautela, pois se ele apresentou toxicidade junto *Staphylococcus aureus*, também pode causar danos a células orgânicas.

Referências Bibliográficas:

- BERTOLONI, G; LAURO, F.M.; CORTELLA, G. & MERCHAT, M. Photosensitizing activity of hematoporphyrin on *Staphylococcus aureus* cells. **Biochimica et Biophysica Acta**. n.1475, p.169-74, 2000.

- BHATTI, M.; MACROBERT, A.; MEGHJI, S.; HENDERSON, B.; WILSON, M. A study of the uptake of toluidine blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. **Photochem Photobiol**. n.68, p.370-6, 1998.

- CHAN, Y.; LAI, C.H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. **Lasers Med Sci**. n.18, p.51-5, 2003.

- DAS, S.C.; KAPOOR, K.N.; MUKHOPADHYAY, M. Comparative evaluation of hydrophobicity measures for virulence determination of *Staphylococcus epidermidis* from hospitalized

patients and healthy individuals. **Indian. J. Med. Res.** n.114, p.160-163, 2001.

- HAMBLIN, M.R.; O'DONNELL, D.A.; MURTHY, N.; RAJAGOPALAN, K.; MICHAUD N.; SHERWOOD, M.E.; HASAN, T. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. **J Antimicrob Chemother**. n.49, p.941-51, 2002.

- MANYAK, M.J. Photodynamic therapy: present concepts and future applications. **Câncer J**. n.3, p.104-9, 1990.

- MERCHAT, M.; BERTOLINI, G.; GIACOMINI, P.; VILLANUEVA, A.; JORI G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. **J Photochem Photobiol B**. n.32, p.153-7, 1996.

- MERCHAT, M.; SPIKES, J.D.; BERTOLONI, G.; JORI, G. Photoinactivation of *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* B by a cationic hydrophilic porphyrin at various light wavelengths. **Curr Microbiol**. n.42, p.408-14, 2001.

- MERCHAT, M.; SPIKES, J.D.; BERTOLONI, G.; JORI, G. Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. **J Photochem Photobiol B**. n.35, p.149-57, 1996.

- MILLSON, C.E.; WILSON, M; MACROBERT, A.J.; BEDWELL, J.; BOWN, S.G. The killing of *Helicobacter pylori* by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **J. Med. Microbiol**. n.44, p.245-252, 1996.

- SAIJONMAA-KOULUMIES, L.E.; LLOYD, D.H. Colonization of neonatal puppies by *Staphylococcus intermedius*. **Vet Dermatol**. n.3, p.123-30, 2002.

- SMETANA, Z.; PASTERNAK, E.; VAN LIER, J.E.; BEN HUR, E.; SALZBERG, S.; MALIK, Z. Photodynamic inactivation of Herpes viruses with phtalocyanine derivatives. **Photohiol. Photochem B J**. n.1, p.37-43, 1994.

- SOUKOS, N.S.; FYVIE, L.A.X.; HAMBLIN, M. R.; SOCRANSKY, S.S.; HASAN, T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. **Antimicro. Agents Chemoter.**, n.42, p.2595-2601, 1998.

- WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Antimicrob Chemother J**. n.42, p.13-28, 1998.

- WISE, R; HART, T; CARS O et al. Antimicrobial resistance. **Br Med J.** n.317, p.609-10, 1998.