

EFEITOS BACTERICIDAS DO VERDE DE MALAQUITA E AZULENO ASSOCIADOS AO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE *ENTEROBACTERIACEAE*

Rossoni, R. D.¹; Ribeiro, M. A.²; Barbosa, J. O.³; Jorge, A. O. C.⁴; Junqueira, J. C.⁵.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” / Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Avenida Francisco José Longo, 777, São José dos Campos – SP; CEP : 12245-000, rdrossoni@terra.com.br

Resumo - O desenvolvimento de resistência aos antibióticos por bactérias patogênicas é um dos maiores problemas da medicina atual tornando importante o estudo da terapia fotodinâmica. O objetivo foi avaliar os efeitos dos fotossensibilizadores verde de malaquita e azuleno associados ao laser de baixa potência sobre cepas de *Enterobacteriaceae* isoladas da cavidade bucal de pacientes. Foram estudadas 12 cepas, sendo 3 *E. coli*, 3 *E. cloacae*, 3 *K. oxytoca* e 3 *K. pneumoniae*. Essas cepas foram submetidas aos seguintes tratamentos: laser e verde de malaquita (L+VM+), laser e azuleno (L+AZ+), laser e solução fisiológica (L+F-), verde de malaquita (L-VM+), azuleno (L-AZ+) e solução fisiológica (L-F-). A seguir, foram realizadas culturas em ágar Infuso Cérebro-Coração para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e os dados submetidos à análise de variância. O grupo L+VM+ reduziu o número de UFC/mL em relação ao grupo controle (L-F-). O grupo L-VM+ apresentou toxicidade para as cepas testadas. Os grupos L+AZ+, L-AZ+ e L+F- apresentaram médias semelhantes ao grupo L-F-. Concluiu-se que todas as cepas estudadas foram sensíveis a terapia fotodinâmica com verde de malaquita.

Palavras-chave: Enterobacteriaceae, fotoquimioterapia, laser de baixa intensidade, verde de malaquita, azulenos

Área do Conhecimento: Microbiologia

Introdução

A resistência antibiótica de bactérias patogênicas é um dos maiores problemas da medicina atual e representa um desafio para o desenvolvimento de modalidades terapêuticas alternativas (ROMANOVA et al. 2003; SALMON-DIVON et al. 2004). O uso indiscriminado de antibióticos na prática familiar e na medicina, associado às infecções hospitalares contribuem para o desenvolvimento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos (SALMON-DIVON et al. 2004). Atualmente, tem sido estudada uma nova modalidade de tratamento para as infecções microbianas, a terapia fotodinâmica (JORI et al. 2006).

A terapia fotodinâmica consiste na associação de um agente fotossensibilizante, normalmente exógeno, e uma fonte de luz, com o objetivo de provocar necrose celular (utilizada em tratamento de tumores) e morte microbiana. O mecanismo de ação se dá quando o agente fotossensibilizante absorve os fótons da fonte de luz e seus elétrons passam a um estado excitado. Na presença de um substrato, como por exemplo, o oxigênio, o agente fotossensibilizante, ao retornar ao seu estado natural, transfere a energia ao substrato, formando espécies altamente reativas e de vida curta, como o oxigênio singlete, que podem provocar sérios danos à célula via

oxidação irreversível de componentes celulares (NAVARRO et al. 2005).

A família *Enterobacteriaceae* é composta por bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, móveis ou imóveis. Representa a maior e mais heterogênea família de bacilos Gram-negativos de importância clínica, sendo descritos 30 gêneros e mais de 120 espécies com inúmeros sorotipos (HOLT et al. 1994; UENO & JORGE 2006). Estes gêneros foram classificados com base nas propriedades bioquímicas, estrutura antigênica e seqüenciamento dos ácidos nucléicos. Apesar, da complexidade dessa família, mais de 95% dos microrganismos isolados clinicamente importantes pertencem a apenas 10 gêneros e incluem menos de 25 espécies (MURRAY et al. 2000).

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da terapia fotodinâmica sobre cepas de *Enterobacteriaceae* isoladas da cavidade bucal humana.

Metodologia

Foram estudadas 12 cepas de *Enterobacteriaceae*, sendo 3 *Escherichia coli*, 3 *Enterobacter cloacae*, 3 *Klebsiella oxytoca* e 3 *Klebsiella pneumoniae*. Cada cepa foi submetida a diferentes condições experimentais (n=6): associação do laser e verde de malaquita

(L+VM+), associação com laser e azuleno (L+AZ+), irradiação apenas como laser (L+F-), tratamento com verde de malaquita (L-VM+), tratamento com azuleno (L-AZ+) e tratamento com solução fisiológica como controle (L-F-). O número de células de cada microrganismo foi padronizado em 10^6 células/mL em espectrofotômetro.

Para a sensibilização das enterobactérias foram utilizados como fotossensibilizadores os corantes verde de malaquita a 0,1% e azuleno a 5%. Ambos os corantes foram filtrados em membrana esterilizada com poros de diâmetro de 0,22 μm . O laser utilizado foi o de Arseneto de Gálio Alumínio com comprimento de onda de 660 nm (vermelho visível), correspondente à faixa de comprimento de alta absorção por esses fotossensibilizadores, potência de 35 mW e densidade de energia de 10 J/cm².

Em placa de microtitulação de 96 poços de fundo plano, esterilizadas e com tampa, foi adicionado 0,1 mL de suspensão de Enterobacteriaceae e 0,1 mL do fotossensibilizador ou de solução fisiológica. A seguir, a placa contendo as amostras foi agitada durante 5 min em agitador orbital. Após esse período, o conteúdo de cada poço foi irradiado de acordo com os grupos previamente descritos acima. A irradiação das amostras foi realizada em condições assépticas em câmara de fluxo laminar e mantida em ambiente escuro utilizando um anteparo negro fosco com orifício de diâmetro coincidente ao da entrada do poço, evitando-se espalhamento de luz.

Após a irradiação, a partir de cada amostra, foram realizadas diluições seriadas e alíquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas em duplicata em placas contendo ágar Infuso Cérebro-Coração (*Brain Heart Infusion Agar* - Difco, Detroit, EUA). Após incubação a 37° C por 48 horas, foi feita a contagem das unidades formadora de colônias e a análise de variância.

Resultados

Nas quatro espécies estudadas, observou-se que a terapia fotodinâmica utilizando verde de malaquita (L+VM+) reduziu significativamente o número de UFC/mL em relação ao grupo controle (L-F-). Entretanto, a terapia fotodinâmica com o fotossensibilizador azuleno (L+AZ-) não diminuiu o número de UFC/mL quando comparada ao grupo controle (L-F-).

O uso isolado do verde de malaquita (L-VM+) induziu redução significativa no número de UFC/mL de *E. cloacae*, *E.coli*, *K.oxytoca*, *K. pneumoniae* em relação ao grupo controle (L-F-), indicando que esse fotossensibilizador apresentou toxicidade para as espécies testadas. Os grupos L-AZ+ e L+F- apresentaram médias de

UFC/mL semelhantes ao grupo controle (L-F-), sugerindo que o uso isolado do azuleno (L-AZ+) e do laser (L+F-) não causaram efeito bactericida sobre as espécies estudadas (Tabela 1).

Tabela 1 - Média de ufc/mL (Log) obtidas nos diferentes grupos experimentais

Grupos	<i>E. cloacae</i>	<i>E.coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K.oxytoca</i>
L+VM+	1,13 ^C	1,86 ^C	1,69 ^C	0,62 ^C
L+AZ+	8,14 ^A	8,10 ^A	7,73 ^A	7,16 ^A
L+F-	7,78 ^A	7,89 ^A	7,44 ^A	7,21 ^A
L-VM+	3,82 ^B	2,94 ^B	3,99 ^B	1,76 ^B
L-AZ+	8,23 ^A	8,15 ^A	7,67 ^A	7,14 ^A
L-F-	8,27 ^A	8,11 ^A	7,71 ^A	7,30 ^A

Grupos Heterogêneos: letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos L+VM+, L+AZ+, L+F-, L-VM+, L-AZ+ e L-F- (Teste de Tukey, $p < 0,05$)

Discussão

Os resultados obtidos na terapia fotodinâmica antimicrobiana dependem da interação do microrganismo com o fotossensibilizador e laser. Segundo Okamoto et al. (1992) e Walsh et al. (1997), as características moleculares dos corantes e da parede bacteriana determinam possíveis combinações entre estes e as diferentes estruturas da célula bacteriana, causando uma maior ou menor reatividade durante a terapia fotodinâmica. Os principais fotossensibilizadores utilizados têm maior dificuldade em interagir com as bactérias gram-negativas devido a sua natureza catiônica, que se opõe a membrana externa carregada positivamente nessas bactérias (DRIESSENS & WÖLTGENS,1986; THYLSTRUP & FEJERSKOV,1995; WAINWRIGHT et al.,1997).

Sendo assim, esse trabalho teve por finalidade estudar os efeitos de dois fotossensibilizadores diferentes (verde de malaquita e azuleno) sobre bactérias Gram-negativas da família Enterobacteriaceae.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que os microrganismos *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca* podem ser inativados pela associação do fotossensibilizador verde de malaquita com laser de baixa intensidade com comprimento de onda de 660 nm, densidade de energia de 10 J/cm² e potência de 35 mW (grupo L+VM+). Segundo Prates et al. (2007), esse fotossensibilizador possui facilidade em atravessar a parede celular tanto das bactérias gram-negativas quanto das gram-positivas, além de possuir uma forte absorção pela luz vermelha no espectro visível.

Em todas as espécies analisadas, o número de UFC/mL reduziu em torno de 6 a 7log₁₀ após a aplicação da terapia fotodinâmica com verde de malaquita a 0,1%. Prates et al. (2007) também encontraram redução de bactérias da espécie *Actinobacillus actinomycetemcomitans* com verde de malaquita a 0,01% combinado com laser de diodo. Entretanto, a redução de UFC/mL observada foi de 2 a 3log₁₀.

Na terapia fotodinâmica com azuleno (L+AZ+) não foi observado percentual de redução significativo em relação ao grupo controle (L-F-), sugerindo que a PDT com azuleno não apresentou toxicidade para as espécies de *Enterobacteriaceae* testadas. Entretanto, alguns trabalhos na literatura obtiveram redução microbiana significativa utilizando o azuleno associado ao laser de baixa potência (GARCEZ et al. 2007; HAYEK et al. 2005). Garcez et al. (2007), após realizarem terapia fotodinâmica *in vitro*, encontraram 99% de redução de *Enterococcus faecalis* no interior do canal radicular. Hayek et al. (2005) verificaram redução de *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp. e *Streptococcus* spp. após aplicação da terapia fotodinâmica na bolsa periimplantar em cães, sendo que o percentual de redução observado foi semelhante ao obtido com a terapia convencional utilizando clorexidina.

Provavelmente, os diferentes resultados obtidos no presente trabalho com os estudos de Garcez et al. 2007 e Hayek et al. 2005, possam ser atribuídos ao modo de preparo do fotossensibilizador. Neste trabalho, foi utilizado solução aquosa de azuleno a 5%, enquanto que Garcez et al. 2007 e Hayek et al. 2005 utilizaram uma pasta de azuleno. A pasta base foi constituída por 10% de peróxido de uréia, 15% de detergente (tween 80) e 75% de veículo (cera carbonada). A essa pasta foi adicionado 400 µL de solução de azuleno a 25% por grama de pasta, resultando em uma concentração final de 0,01% de azuleno.

Neste trabalho, observou-se também que o uso isolado do verde de malaquita a 0,1% levou a uma redução microbiana, sugerindo que o verde de malaquita na concentração testada apresentou efeito bactericida sobre os quatro microrganismos estudados. Entretanto, o uso isolado do laser (grupo L+F-) e do azuleno (grupo L-AZ+) apresentaram médias de UFC/mL semelhantes ao grupo controle (L-F-), demonstrando que somente a aplicação do laser ou do azuleno não causaram sensibilização às espécies testadas.

Os resultados desse trabalho comprovaram a eficiência do verde de malaquita como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica para as *Enterobacteriaceae* estudadas. Sendo assim, torna-se importante dar sequência aos estudos desses corantes sobre as diferentes cepas de bactérias afim de estabelecer um protocolo ideal

de terapia fotodinâmica e dos presentes resultados apresentados como uma alternativa aos tratamentos convencionais utilizados.

Conclusão

Concluiu-se que:

- O verde de malaquita foi eficaz como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica para *E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*.
- O uso isolado do verde de malaquita apresentou efeito bactericida sobre todos os microrganismos estudados.

Agradecimentos

Agradecemos pelo suporte financeiro à FAPESP (07/54442-3).

Referências

- DRIESSENS, F.C.M; WÖLTGENS, J.H.M. Tooth development and caries. Florida: CRC Press, cap.6, 131-142, 1986.
- GARCEZ, A.S. et al. Efficiency of NaOCl and laser assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, v.102, n.4, p.93-8, Oct. 2007.
- HAYEK, R.R.A et al. Comparative study between the effects of Photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. J Periodontol. 76(8): 1275-1281, 2005.
- HOLT, J.G et al. Facultatively anaerobic Gram-negative rods. In: Bergey's manual of determinative bacteriology. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p.175-89, 1994.
- JORI, G et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. Lasers Surg Med. 38(5): 468-81, 2006.
- MURRAY, P.R et al. *Enterobacteriaceae*. In: Microbiologia Médica. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 193-203, 2000.
- NAVARRO, R.S; EDUARDO, C.P; ZEDEL, D.M; RIBEIRO, M.S. Terapia fotodinâmica no tratamento restaurador atraumático. In: Imparato JC et al. ART Tratamento Restaurador Atraumático. Maio: Curitiba, p.339-59, 2005.
- OKAMOTO, H; IWASE, T; MORIOKA, T. Dye-mediated bactericidal effect of He-Ne laser

irradiation on oral microorganisms. *Lasers Surg Med.*12(4): 450-458, 1992.

- PRATES, R.A et al. Bacterial effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Photochem Photobiol B.* 86(1): 70-6, 2007.

- ROMANOVA, N.A; BROVKO, L.Y; MOORE, L; POMETUN, E; SAVITSKY, A.P; UGAROVA, N.N; GRIFFITS, M.W. Assessment of photodynamic destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by using ATP Bioluminescence. *Appl Environ microbial.* 69(11): 6393-8, 2003.

- SALMON-DIVON, M; NITZAN Y; MALIK, Z. Mechanistic aspects of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by cationic tetra-meso (N-methylpyridyl) porphine. *Photochem Photobiol Sci.* 3(5): 423-9, 2004.

- THYLSTRUP, A; FEJERSKOV, O. As características clínicas e patológicas da cárie dentária. In: Thylstrup A, Fejerskov O. *Cariologia Clínica*. São Paulo: Editora Santos, cap.6, 45-69, 1995.

- UENO, M; JORGE, AOC. Bacilos Gram-negativos. In: Jorge AOC. *Princípios de Microbiologia e Imunologia*. São Paulo: Santos. p. 65-84, 2006.

- WAINWRIGHT et al. A study of photobacterial activity in the phenothiazinium series. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 19(1):75-80, 1997.

- WALSH, L.J. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 2. Hard tissue applications. *Aust Dent J.* 42(5): 302-6, 1997.