

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA EM ESPECTROS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PÓS TERAPIA FOTODINÂMICA COM CURCUMINA

Camila Monteiro Santos Marques¹, Kumiko Koibuchi Sakane¹, Lucas Ferreira Lyra¹, Juliana Teixeira Pedroso², Juliana Guerra Pinto², Juliana Ferreira-Strixino².

Laboratório de Espectroscopia Vibracional do Infravermelho, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento IP&D, Universidade do Vale do Paraíba - Univap. Avenida Shishima Hifumi, 2911, CEP 12244-000, São José dos Campos, São Paulo, Brasil, camonteioromarkes@gmail.com, kumiko@univap.br, lucasferreiralyra@gmail.com.

Fotobiologia Aplicada à Saúde (PhotoBios) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - I&PD, Universidade do Vale do Paraíba - Univap. Avenida Shishima Hifumi 2911, CEP 12244-000 São José dos Campos, São Paulo, Brasil, juliana.teixeira.pedroso@hotmail.com, jgbiomd@gmail.com, juferreira@univap.br.

Resumo

A utilização da Terapia Fotodinâmica com Curcumina e Espectroscopia Vibracional no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) como ferramenta de análise dos espectros infravermelhos de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), foram utilizadas neste trabalho. Os grupos experimentais foram divididos em Controle (CTL), Fotossensibilizador (FS), Irradiado (IRR) e Terapia Fotodinâmica (TFD). Os grupos FS e TFD foram incubados com Curcumina durante 20 minutos. Em seguida, o grupo TFD e IRR foram irradiados utilizando dispositivo de LED em 450 nm com densidade de potência de 50 mW/cm², totalizando densidade energética de 30,6 J /cm². O método de Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA), foi utilizado com objetivo de interpretar semelhanças e diferenças dos espectros perante os diferentes tratamentos.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Terapia fotodinâmica. FT-IR, Análise Estatística Multivariada.

Área do Conhecimento: Engenharias – Engenharia Biomédica

Introdução

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo considerado um agente infeccioso de alta prioridade pela Organização Mundial da Saúde (OMS) por produzir mecanismos moleculares capazes de degradar agentes antimicrobianos. (DA FONSECA, MENCALHA, DE PAOLI, 2021). Diante disto, a Terapia Fotodinâmica (TFD) tem sido estudada como tratamento alternativo à terapia antimicrobiana em infecções bacterianas, pois seu efeito não induz ao aparecimento de cepas resistentes aos antibióticos. (CAVALCANTI, 2011; PANG *et al.*, 2019; DASCALU *et al.* 2020; BABINSK *et al.*, 2022).

O efeito da TFD acontece pelo uso de um fotossensibilizador, fonte de luz visível em comprimento de onda adequado ao fotossensibilizador e oxigênio molecular. (SELLERA *et al.*, 2014; CROUS; ABRAHAMSE, 2022). A partir disto, reações oxidativas ocorrem, resultando em formação de espécie reativas de oxigênio (ERO) que geram danos irreversíveis em biomoléculas resultando em morte celular bacteriana por apoptose. (NICULESCU *et al.*, 2021, POLAT *et al.*, 2021; INADA *et al.* 2021)

Diversos estudos evidenciam o uso da Curcumina como fotossensibilizador em TFD e sua aplicação é promissora contra agentes bacterianos. (SANTEZI *et al.*, 2018; BABINSKI *et al.*, 2022; KUBRAK *et al.*, 2022)

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Como ferramenta de análise, a Espectroscopia Vibracional do Infravermelho (FT-IR) se destaca na área da microbiologia pois fornece de forma rápida e não destrutiva a composição molecular de amostras biológicas, permitindo identificar, diferenciar e classificar complexos sistemas biológicos por meio do espectro infravermelho (STUART, 1997; BARTH, 2007; TENG SUTTIWAT *et al.*, 2022). Para facilitar a interpretação dos espectros, já que a maioria dos espectros bacterianos são muitos semelhantes, recorre-se a Análise Estatística Multivariada. (NOOR *et al.*, 2020; DAVIS; MAUER 2010). O método de Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA), foi utilizado neste trabalho para identificar possíveis diferenças entre os espectros de CTL, IRR, FS e TFD de *P.aeruginosa* a fim de verificar como os grupos se relacionam, ou seja, o quanto são semelhantes segundo as variáveis utilizadas no estudo.

Metodologia

Foram utilizadas cepas ATCC (*American Culture Type Collection*) de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 278530™).

As cepas encontravam-se acondicionadas em freezer a -20 °C em caldo infusão cérebro e coração (*Brain Heart Infusion, BHI*) com 5% de glicerol.

As cepas de *P.aeruginosa* foram reativadas em temperatura ambiente, e inoculadas em caldo BHI e posteriormente incubadas a 37° C por 24 horas, semeadas em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas novamente.

Colônias foram coletadas e diluídas em solução salina (NaCl) a 0,9 % constituindo a solução bacteriana de trabalho. Comparou-se visualmente sua turbidez com a escala 10 de *McFarland* (aproximadamente 3×10^8 bactérias por mL).

O fotossensibilizador (FS) utilizado para os experimentos foi a Curcumina sintética. O seu preparo iniciou-se com a pesagem em ausência de luz de 50 mg do FS diluído em um becker em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) em ambiente estéril. Após esse procedimento adicionou-se 9 mL de álcool etílico 99%. O FS foi filtrado, formando a solução de estoque com a concentração de 5 mg. mL. Para formar a solução fotossensibilizadora utilizada no experimento, diluiu-se a 25 µL de solução de estoque em 2475 µL solução fosfato-salino (PBS).

As amostras foram divididas em 4 tubos de ensaio correspondentes aos grupos: CTL (controle), FS (fotossensibilizador), IRR (irradiado) e TFD (Terapia Fotodinâmica). O grupo CTL continha somente solução bacteriana, sem adição de solução fotossensibilizadora, o grupo FS continha solução bacteriana e solução fotossensibilizadora, o grupo IRR continha somente solução bacteriana sem adição de solução fotossensibilizadora e o grupo TFD continha solução bacteriana e solução fotossensibilizadora. Todos os grupos foram centrifugados a 3500 rpm por 15 minutos, e o sobrenadante desprezado.

Nos grupos FS e TFD foi adicionado 1 mL de solução fotossensibilizadora, todos protegidos da luz ambiente, para evitar fotodegradação. Nos grupos CTL e IRR foram adicionados 1 mL de solução salina e todos eles homogeneizados. Todos os grupos foram incubados a 37 °C por 20 minutos.

Após a incubação, as amostras dos grupos FS e TFD foram transferidas para uma placa de 24 poços, e irradiadas em *Biotable (Biotable/Biopdi450)* com 48 LEDs em comprimento de onda de 450 nm, densidade de potência de 50 mW.cm² e tempo de irradiação de 625 segundos, totalizando densidade energética de 30,6 J .cm².

Após a irradiação, as amostras foram transferidas para seus respectivos tubos de ensaio para o processo de lavagem com solução salina. Em seguida, foram preparadas para leitura em espectrofotômetro *Spectrum Spotlight 400* (FT-IR) da *Perkin-Elmer*.

A solução bacteriana foi depositada em janela de fluoreto de bário e lâminas (substrato transparente no infravermelho) e desidratada à 37°C para se obter uma película transparente.

Os espectros foram normalizados em 1 unidade de absorção (UA) em relação a amida I (~1655 cm⁻¹) dentro da faixa linear do detector MCT (*Mercury Cadmium Telluride*) usando o *software Spectrum 5.3®*.

Para cada espectro de FT-IR foram realizadas 32 varreduras, com resolução de 4 cm⁻¹, e a temperatura ambiente foi controlada em 20°C. Todos os espectros eram altamente reprodutíveis e mostravam uma boa relação sinal-ruído. Foram realizados três experimentos independentes, cada um com 60 espectros obtidos, para garantir a fidelidade dos resultados.

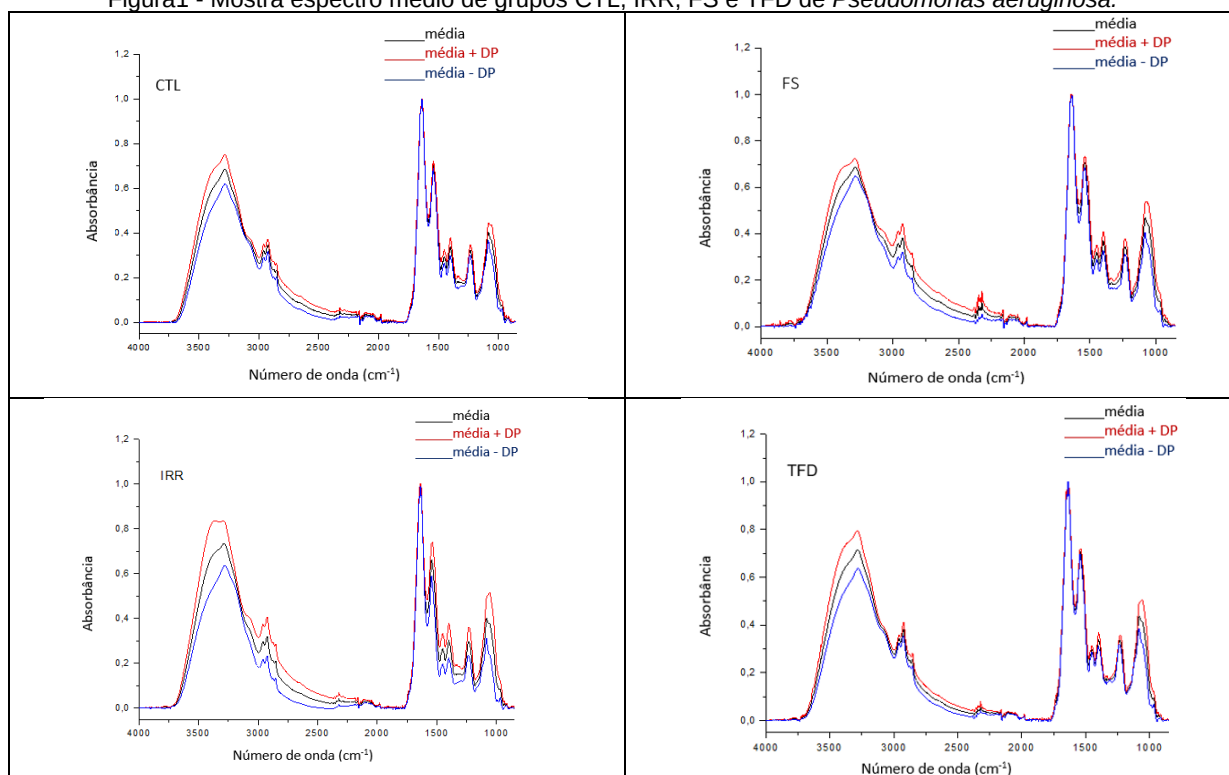
A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Os espectros processados com o *software Spectrum 5.3* foram plotados em gráficos no *software Origin. Pro 8.5*. Posteriormente, a grande quantidade de dados foi submetida à Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis - PCA*) no *software Minitab 17* para a redução do conjunto de dados à menor matriz ortogonal por meio da covariância dos dados. A matriz obtida foi então submetida a Análise de Agrupamento Hierárquico (*Hierarchical Cluster Analysis - HCA*) para classificar as variáveis em grupos de acordo com a similaridade estatística dos componentes avaliados. Para a análise de agrupamento foram utilizados os parâmetros: distância euclidiana para a medida de similaridade e o algoritmo para agrupamento hierárquico, o *Ward*, conhecido como variância mínima que permite agrupar os *clusters* de forma a produzir o mínimo de aumento de variância. Os resultados são mostrados através de dendrograma.

Resultados

A figura 1 mostra espectro infravermelho das amostras de *P.aeruginosa* dos grupos controle (CTL), fotossensibilizador (FS), irradiada (IRR) e Terapia Fotodinâmica (TFD).

Figura1 - Mostra espectro médio de grupos CTL, IRR, FS e TFD de *Pseudomonas aeruginosa*.

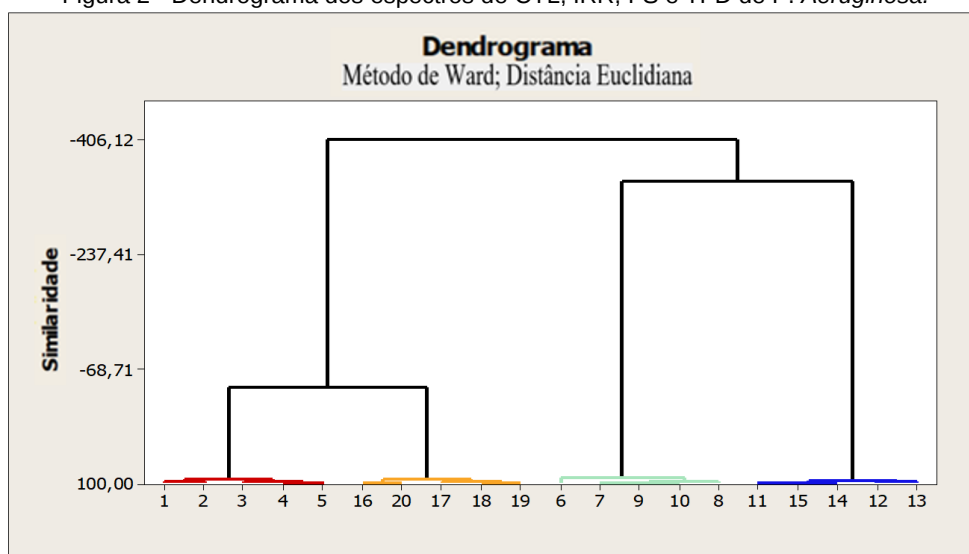


Fonte: Os autores.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Na figura 2, visualizam-se os *clusters* formados através do dendrograma para diferenciação dos espectros dos grupos CTL (1 a 5), IRR (11 a 15), FS (6 a 10) e TFD (16 a 20) de *P.aeruginosa*.

Figura 2 - Dendrograma dos espectros de CTL, IRR, FS e TFD de *P. Aeruginosa*.



Fonte: Os autores.

A Tabela 1 mostra os valores de similaridade entre os grupos CTL, FS, IRR e TFD de *P. aeruginosa*.

Tabela 1 - Valores de similaridade entre CTL, FS, IRR, TFD de *P. aeruginosa*.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Similaridade</i>
1 a 5	93,70%
6 a 10	90,44%
11 a 15	95,61%
16 a 20	93,03%
(1 a 5) e (16 a 20)	-42,03%
(6 a 10) e (11 a 15)	-344,99%
[(1 a 5) e (16 a 20)] e [(6 a 10) e (11 a 15)]	-406,12%

Fonte: os autores.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Discussão

Analisando os espectros infravermelhos de *P.aeruginosa* de acordo com a figura 1, notam-se que são visualmente idênticos, ou seja, os números de picos e contornos de bandas são semelhantes, e não apresentam aparecimento ou desaparecimento de bandas com diferentes tratamentos. Trata-se de um tecido biológico complexo, com inúmeros constituintes biomoleculares como lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, portanto, muitos modos normais de vibração se sobrepõem, produzindo alargamento de bandas.

Para facilitar a interpretação dos espectros, já que a maioria dos espectros bacterianos são muitos semelhantes, recorre-se a Análise Estatística Multivariada. (NOOR *et al.*, 2020; DAVIS; MAUER 2010).

Para a Análise Estatística Multivariada dos espectros de *P. aeruginosa* dos grupos CTL, FS, IRR e TFD, aplicou-se Análise de Agrupamento Hierárquico.

O objetivo é verificar como os grupos se relacionam, ou seja, o quanto são semelhantes segundo as variáveis utilizadas no estudo. Este método tem a capacidade de analisar a vasta distribuição espectral e discriminar completamente os espectros de diferentes amostras que mostram poucas alterações. (SINGH *et al.*, 2012).

Utilizou-se as regiões de 3600 a 2800 cm^{-1} e 1800 a 800 cm^{-1} dos espectros infravermelhos, excluindo as regiões de 4000 a 3600 cm^{-1} e 2800 a 1800 cm^{-1} por apresentarem muitos ruídos instrumentais que não apresentam informações estruturais importantes.

De acordo com a figura 2, o dendrograma mostra que houve separação entre os grupos, ou seja, houve discriminação dos espectros das amostras de CTL, FS, IRR e TFD. Apesar da complexa estrutura do microrganismo, com inúmeros constituintes biomoleculares e os diferentes tratamentos a qual foi submetido, o algoritmo foi capaz de discriminar os espectros de todos os grupos.

Neste experimento, os grupos CTL e TFD formam o primeiro *cluster*. O grupo FS e grupo IRR, formam o segundo *cluster*. Observa-se que esta associação, mostra maior grau de dissimilaridade com o primeiro *cluster* como mostrado na tabela 1. Os espectros de todos os grupos mostram-se homogêneos e o grau de dissimilaridade é significativamente maior entre os grupos (-406,12%), demonstrando separação entre eles. Os valores negativos indicam que não há similaridade entre os espectros infravermelhos entre os grupos de todos os tratamentos na região analisada.

Conclusão

Através da Espectroscopia Vibracional do Infravermelho, os espectros dos grupos CTL, IRR, FS e TFD de *Pseudomonas aeruginosa* foram analisados por inspeção visual direta, apresentando-se visualmente idênticos devido as posições muito próximas do número de ondas dos componentes biomoleculares. No entanto, a Análise Estatística Multivariada discriminou os espectros de todos os grupos.

Através do dendrograma, observou-se diferenças em associações entre os espectros de cada grupo demonstrando a complexidade deste micro-organismo, que é muito sensível à microambientes e responde de forma diferente as alterações do meio.

Referências

BARTH A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochim Biophys Acta**. 2007;1767(9):1073-1101. doi:10.1016/j.bbabbio.2007.06.004

BABINSKY, Tatiane Patrícia; PAULA, Daniel de; TOMINAGA, Tania Toyomi. Uso da Curcumina na Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana: Uma revisão In: **Anais do Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas - SINCIFAR**. Belo Horizonte (MG) UFMG, 2021. Disponível em: <<https://www.even3.com.br/anais/sincifar2021/451827-USO-DA-CURCUMINA-NA-TERAPIA-FOTODINAMICA-ANTIMICROBIANA--UMA-REVISAO>>. Acesso em: 08/08/2022 17:26

CROUS, Anine; ABRAHAMSE, Heidi. Photodynamic therapy of lung cancer, where are we? **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 2022.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

DA FONSECA, Adenilson de Souza; MENCALHA, Andre Luiz; DE PAOLI, Flavia. Antimicrobial photodynamic therapy against *Acinetobacter baumannii*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 35, p. 102430, 2021.

DAVIS, R.; MAUER, L.J. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: A rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (ed). **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**. Badajoz, Spain: Formatex, 2010. p. 1582-1594. (Microbiology Series Nº 2).

DASCALU, Laura Monica *et al.* Assessment and characterization of some new photosensitizers for antimicrobial photodynamic therapy (aPDT). **Materials**, v. 13, n. 13, p. 3012, 2020.

INADA, Natalia M. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy of the respiratory tract: from the proof of principles to clinical application. **Photodyn. Ther.-From Basic Sci. to Clin. Res., IntechOpen, London**, p. 177, 2021.

KUBRAK TP, KOLODZIEJ P, SAWICKIS J, MAZUR A, KOZIOROWSKAK K, AEBISHER D. Some Natural Photosensitizers and Their Medicinal Properties for Use in Photodynamic Therapy. **Molecules**. 2022;27(4):1192. Published 2022 Feb 10. doi:10.3390/molecules27041192

NICULESCU, A.-G.; GRUMEZESCU A.M. Photodynamic Therapy—An Up-to-Date **Review. Appl. Sci.** 2021, 11, 3626.

NOOR, Hazrat *et al.* Insight on esterase from *Pseudomonas aeruginosa* strain S3 that depolymerize poly (lactic acid) (PLA) at ambient temperature. **Polymer Degradation and Stability**, v. 174, p. 109096, 2020. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMEDEGRADSTA.BAUMANNII.2020.109096>

PANGP Z, RAUDONIS R, GLICK BR, LIN TJ, CHENG Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. (“**A novel structurally identified epitope delivered by macrophage ...**”) **Biotechnol Adv.** 2019 Jan-Feb;37(1):177-192. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013.

POLAT E, KANG K. Natural Photosensitizers in Antimicrobial Photodynamic Therapy. **Biomedicines**. 2021 May 21;9(6):584. doi: 10.3390/biomedicines9060584. PMID: 34063973; PMCID: PMC8224061.

SANTEZI, Carolina; REINA, Bárbara Donadon; DOVIGO, Livia Nordi. Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections—A review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 409-415, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.01.016>

SELER F GARGANO R; POGLIANI F. Terapia fotodinâmica: revisão de literatura. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v.12, 2014. Disponível em: <https://www.revistamvez-crmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/23097>

SINGH, Bhawana *et al.* Application of vibrational microspectroscopy to biology and medicine. **Special section: Chemistry and biology; Current Science**, v 102, p.232-244, 2012.

STUART, B. Biological Applications of infrared Spectroscopy. **Baffins Lane: John Wiley & Sons**, 1997

TENGSTUTTIWAT T, KADERBHAI NN, GALLAGHER J, GOODACRE R, MUHAMADALI H. Metabolic Fingerprint Analysis of Cytochrome b5-producing *E. coli* N4830-1 Using FT-IR Spectroscopy. **Front Microbiol.** 2022;13:874247. Published 2022 Jun 22. doi:10.3389/fmicb.2022.874247