

**Título em Português:**

Estudo de uma nanoemulsão de porfirina e seu efeito antimicrobiano associado à Terapia Fotodinâmica no tratamento do trato respiratório

**Título em Inglês:**

study of a porphyrin nanoemulsion and its antimicrobial effect associated to photodynamic therapy in the respiratory tract

**Autor:**

Ana Júlia Barbosa Tomé

**Instituição:**

Universidade de São Paulo

**Unidade:**

Instituto de Física de São Carlos

**Orientador:**

Cristina Kurachi

**Área de Pesquisa / SubÁrea:** Biotecnologia

**Agência Financiadora:**

USP - Programa Unificado de Bolsas

# **Estudo de uma nanoemulsão de porfirina e seu efeito antimicrobiano associado à Terapia Fotodinâmica no tratamento do trato respiratório**

**Ana Júlia Barbosa Tomé**

**Hilde Harb Buzzá**

**Cristina Kurachi**

Universidade de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos

anajuliabarbosatome@usp.br

## **Objetivos**

Este projeto visa analisar a interação *in vitro* de uma nanoemulsão de porfirina [1] com microorganismos causadores de pneumonia. Tempo de incubação, concentração e dose de luz foram variados a fim de que fossem selecionados os melhores parâmetros para a aplicação da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa). A nanoplateforma em estudo é um fotossensibilizador que possibilita o carregamento de diferentes moléculas em seu interior. Assim, essa nanoemulsão foi testada contra dois microrganismos: *S. pneumoniae* e *S. aureus*.

## **Métodos e Procedimentos**

A fim de verificar a eficácia da nanoemulsão de na eliminação de microorganismos causadores de pneumonia, parâmetros como tempo de incubação, dose de luz e concentração do fotossensibilizador foram variados. Os microorganismos utilizados até o momento foram *S. pneumoniae* e *S. aureus*.

O cultivo de *S. pneumoniae* foi feito em uma atmosfera de CO<sub>2</sub>, por 3 horas, quando foi lida a D.O. e a concentração final foi ajustada para 10<sup>6</sup> UFC/mL. Para a *S. aureus* o inóculo foi realizado em 3 diferentes dias: no primeiro, espalhou-se a bactéria diretamente do estoque em uma placa de BHI; no segundo, 3 colônias foram colocadas em 5ml de meio de cultura líquido (BHI), e no terceiro, 100 microlitros foram colocados em 10ml do mesmo meio

líquido. Após 3 horas, a D.O. do microorganismo foi lida para ajustar sua concentração para 10<sup>6</sup> UFC/mL.

As doses de luz utilizadas foram de 15 e 30 J/cm<sup>2</sup>, com 5 e 10 minutos de iluminação, respectivamente. A irradiância utilizada foi de 50 mW/cm<sup>2</sup>. Além disso, o tempo de incubação, ou seja, o tempo de interação entre o microorganismo e a molécula fotossensível, foi variado entre 0, 20 e 60 minutos. Por fim, as concentrações da nanoemulsão variaram de 0,5 nM a 100 µM para a *S. pneumoniae* e de 5 a 500 nM para a *S. aureus*.

## **Resultados**

Os experimentos *in vitro* mostraram que a morte dos microorganismos analisados depende da dose de luz aplicada, concentração e tempo de incubação. Para o microorganismo *S. pneumoniae*, a inativação fotodinâmica foi mais eficaz, levando à eliminação completa deste com concentrações menores da nanoemulsão comparada ao *S. aureus*. O gráfico 1 mostra que concentrações de 25 nM foram suficientes para eliminar a *S. pneumoniae* (redução de 6 logs) com dose de luz de 15 J/cm<sup>2</sup> e menor tempo de incubação aplicados. Já para o patógeno *S. aureus*, 500 nM, uma dose de 30 J/cm<sup>2</sup> e 1h de incubação foi necessário para eliminá-la completamente. Ou seja, uma concentração 20 vezes maior da mesma molécula e dose de luz foram necessários para eliminar *S. aureus* com relação a *S. pneumoniae*. Mesmo assim, concentrações menores que 1 µM foram

suficientes para a eliminação completa de ambos os microrganismos, mostrando a alta eficiência da molécula.

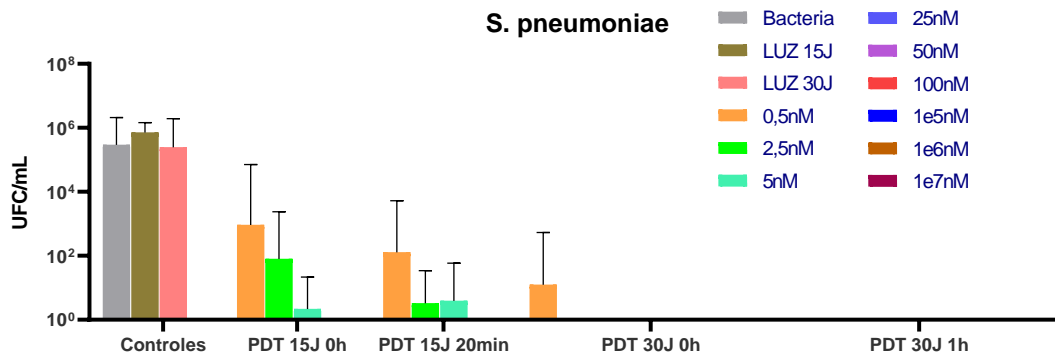


Figura 1: Análise da TFD em *S. pneumoniae*

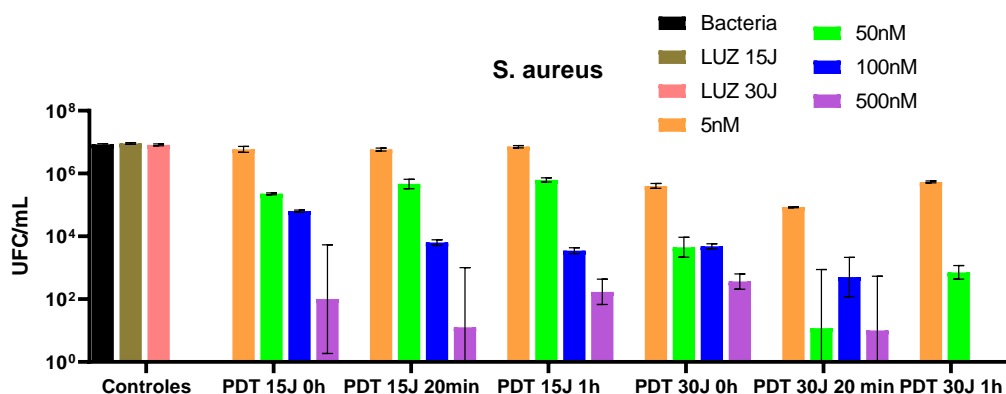


Figura 2: Análise da TFD em *S. aureus*

## Conclusões

A Terapia fotodinâmica associada à nanoemulsão de porfirina mostrou-se ser uma ótima alternativa para a eliminação de microrganismos causadores de pneumonia, já que concentrações em ordem de grandeza nanométricas apresentaram morte total dos microrganismos analisados.

## Referências Bibliográficas

- [1] Hou, W.; Lou, J.W.H.; et al. A Nanoemulsion with A Porphyrin Shell for Cancer Theranostics. *Angewandte Chemie - International Edition*, v. 58, n. 42, p. 14974–14978, 2019

## Study of a porphyrin nanoemulsion and its antimicrobial effect associated to Photodynamic Therapy in the respiratory tract

Ana Júlia Barbosa Tomé

Hilde Harb Buzzá

Cristina Kurachi

University of São Paulo, Physics Institute of São Carlos

anajuliabarbosatome@usp.br

### Objectives

This project has the aim to analyze the interaction between a porphyrin nanoemulsion [1] and different microorganisms. Time of incubation, light dose and concentration were varied so that the best parameters of antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) could be chosen. The nanoplatform in this study is a photosensitizer (FS) that has the capability of carrying other molecules in its core. The nanoemulsion was tested against two microorganisms: *S. aureus* and *S. pneumoniae*.

### Materials and Methods

In order to verify the efficacy of the nanoemulsion in the elimination of microorganism that can cause pneumonia, time of incubation, light dose and concentration were varied. *S. aureus* and *S. pneumoniae* were the microorganisms selected to this study.

*S. pneumoniae* was grown in a CO<sub>2</sub> atmosphere for 3 hours, and then the O.D. was analyzed so that the final concentration could be adjusted to 10<sup>6</sup> CFU/mL. *S. aureus* inoculum was divided in three different steps: at day one, the bacteria was passed from the stock solution to a BHI plate through an inoculation loop; at day two, 3 colonies were transferred from the plate to a falcon with BHI liquid media; at day three, 100 microliters of the solution prepared at day 2 were added to a new falcon with 10mL of

liquid BHI. After 3 hours, the O.D. were accomplished so that the final concentration could be 10<sup>6</sup> CFU/mL.

Light doses used were 15 and 30 J/cm<sup>2</sup>, which correspond to 5 and 10 minutes of illumination respectively. The irradiance was 50 mW/cm<sup>2</sup> and the time of incubation of the nanoemulsion was varied between 0, 20 and 60 minutes. Finally, concentration varied from 0,5 nM to 100 μM for *S. pneumoniae* and from 5 to 500 nM for *S. aureus*.

### Results

*In vitro* experiments showed that microorganisms death depend of applied light dose, concentration and time of incubation. For *S. pneumoniae*, aPDT was more effective, leading to the complete elimination of this microorganism. Lower concentrations were compared to the ones applied on *S. aureus*.

Graph 1 shows that a 25 nM concentration were effective for a log reduction of *S. pneumoniae* with the lowest light dose (15 J/cm<sup>2</sup>) and time of incubation applied. For the pathogen *S. aureus*, a 500 nM concentration, 30 J/cm<sup>2</sup> light dose and

1h time of incubation were needed for the complete elimination of it. That means that a concentration 20 times bigger is needed to the 100% death of *S. aureus* when comparing to *S. pneumoniae*.

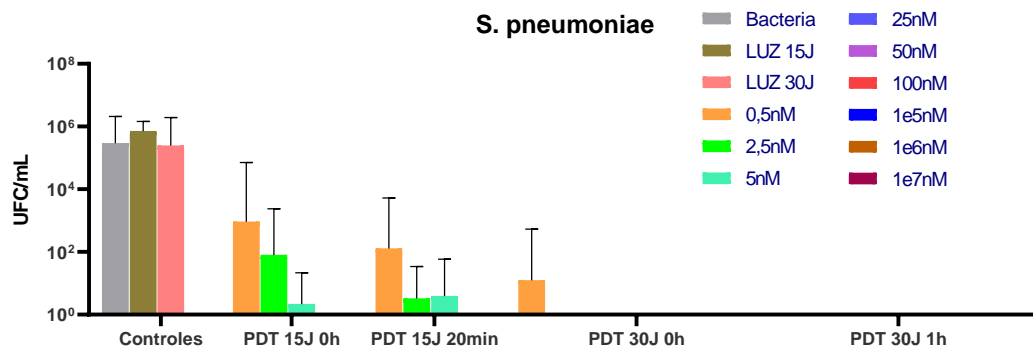


Figura 1: Analysis of PDT in *S. pneumoniae*

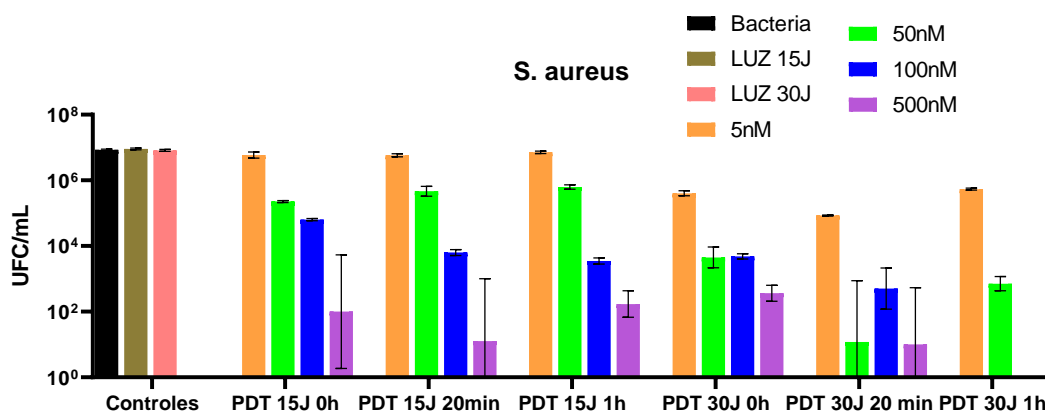


Figura 2: : Analysis of PDT in *S. aureus*

## Conclusions

Photodynamic Therapy associated to porphyrin nanoemulsion has showed to be an excellent alternative to the elimination of microorganisms that can cause bacterial pneumonia. That could be concluded due to the low concentration needed for the 100% elimination of the pathogens tested.

## References

[1] Hou, W.; Lou, J.W.H.; et al. A Nanoemulsion with A Porphyrin Shell for Cancer Theranostics. *Angewandte Chemie - International Edition*, v. 58, n. 42, p. 14974–14978, 2019