

## Trabalho

**Título em Português:** Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana na inativação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*

**Título em Inglês:** Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy in the inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm

**Autor:** Leonardo da Cruz Rea

**Instituição:** Universidade de São Paulo

**Unidade:** Instituto de Física de São Carlos

**Orientador:** Cristina Kurachi

**Área de Pesquisa / SubÁrea:** Radiologia e Fotobiologia

**Agência Financiadora:** CNPq - PIBIC

## **Avaliação da Inativação Fotodinâmica em Biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa***

**Leonardo da Cruz Rea**

**Maria Júlia de A. M. Marques, Fernanda Alves**

**Cristina Kurachi**

**Universidade de São Paulo**

leonardocr@usp.br

### **Objetivos**

*Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria gram-negativa, é responsável por 7% de todas as infecções adquiridas em hospitais. Apesar dos avanços na medicina e na terapia com antibióticos, as infecções por *P. aeruginosa* ainda resultam em altas taxas de mortalidade, chegando a 62% em certos grupos de pacientes. Esta bactéria também é conhecida por formar biofilmes que podem ser de 10 a 1000 vezes mais resistentes aos antibióticos em comparação com sua forma planctônica. A Inativação Fotodinâmica (IFD) tem se mostrado uma técnica antimicrobiana eficaz para o controle microbiano. Este método envolve a incubação do patógeno com um fotossensibilizador (PS), e então uma luz de comprimento de onda adequado é aplicada, levando à produção de espécies reativas de oxigênio que são tóxicas para as células microbianas.

O objetivo do presente estudo é avaliar a eficácia da Inativação Fotodinâmica (PDI) contra o biofilme de *P. aeruginosa* com a adição de iodeto de potássio (KI) à solução de fotossensibilizador, a fim de aumentar a eficácia do tratamento.

### **Materiais e Métodos**

A cepa de *P. aeruginosa*, número ATCC 27853, foi armazenada a -20°C e cultivada em placa de ágar Brain Heart Infusion (BHI) sob incubação a 37°C por 24 horas. Em seguida, o pré-inóculo foi preparado transferindo 10 colônias para 10 mL de Caldo Tryptic Soy (TSB) por 18 horas (durante a noite). Posteriormente, o inóculo foi preparado com 1 mL do pré-inóculo e 9 mL de TSB fresco, que foi incubado por 3 horas a 37°C até que as bactérias atingissem a fase “mid-log” ou fase exponencial média de crescimento. A suspensão bacteriana foi ajustada para uma concentração de aproximadamente  $2 \times 10^8$  UFC/mL (densidade óptica entre 0,1 e 0,2), em um espectrômetro (Cary UV-Vis 50, Varian, versão 3.0), no comprimento de onda de 600 nm.

Em seguida, 100 µL foram transferidos para a placa de 96 poços, que foi incubada a 37°C com agitação de 75 rpm por 90 minutos (fase de adesão). Após esse período, as amostras foram lavadas duas vezes com 100 µL de solução salina e incubadas com 200 µL

de meio TSB por 48 horas, para a maturação do biofilme. Após a formação do biofilme, as amostras foram lavadas duas vezes com solução salina e incubadas por duas horas com o fotossensibilizador (PS) previamente selecionado, com a adição de iodeto de potássio (KI) nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 mM. Em seguida, as amostras foram irradiadas a 660 nm, com fluência de 60 J/cm<sup>2</sup> e irradiância de 50 mW/cm<sup>2</sup>. Finalmente, os biofilmes foram desagregados esfregando a ponta da pipeta no fundo do poço em diferentes direções (horizontal, vertical e circular) por 30 segundos. A diluição seriada foi então realizada e as amostras foram plaqueadas em duplicata em meio de ágar BHI. As placas foram incubadas em condições aeróbicas a 37°C por 24 horas, seguidas pelo cálculo de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Esses testes foram realizados em duplicata em três ocasiões distintas (n = 6).

## Resultados

Estudos anteriores<sup>1</sup> mostraram que o biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* é completamente inativado pelo fotoproduto (PP) gerado pela reação fotodinâmica utilizando 10 µM de azul de metileno (MB) associado a 100 mM de iodeto de potássio (KI). Embora haja dados na literatura que mostram que a forma planctônica da bactéria é reduzida até a erradicação com diferentes concentrações de KI (1, 10, 25, 50, 100 mM)<sup>2</sup>, nenhum estudo correlacionou essa variação com o fotoproduto e ainda em biofilmes. Portanto, as concentrações de 25, 50 e 75 mM de KI foram selecionadas para serem testadas em biofilmes, tanto para as ações da IFD quanto do fotoproduto.

Os fotoprodutos de iodo permanecem em uma concentração suficiente para inibir o crescimento bacteriano. Isso se deve ao fato de que as espécies reativas de iodo são mais

estáveis e têm uma vida útil mais longa do que as espécies reativas de oxigênio e o oxigênio singlete. Também pode ser observado que o fotoproduto realiza a inativação de forma mais eficiente. Isso indica que o uso de fotoprodutos é promissor em comparação com o tratamento do biofilme com terapia fotodinâmica antimicrobiana.

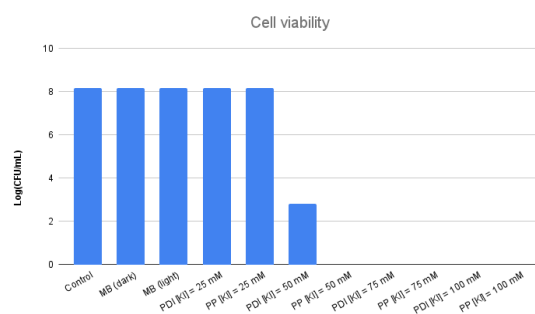
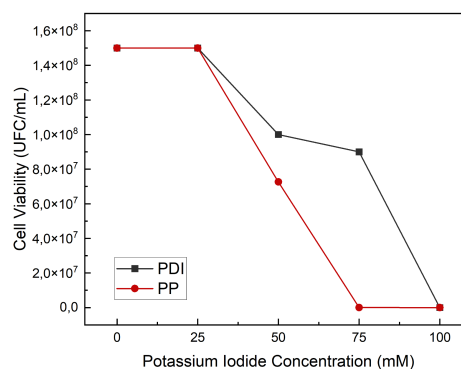


Figura 1: CFU/mL contados em cada grupo.



Picture 2: Viabilidade celular (CFU/mL) de acordo com a concentração de iodeto de Potássio (mM).

## Conclusões

A eficiência da inativação fotodinâmica contra biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* associados ao sal inorgânico KI foi demonstrada. Houve inativação completa tanto pelo tratamento convencional quanto com o uso de fotoprodutos de iodo ao utilizar [KI] = 100 mM. A inativação parcial ocorreu entre [KI]

= 50 e 75 mM, enquanto concentrações mais baixas não mostraram efeito. A inativação por meio dos fotoprodutos parece ocorrer de forma mais rápida e eficiente.

## **Agradecimentos**

Este estudo foi conduzido com amparo da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Número de Protocolo: 167630/2023-7.

## **Referências**

[1] Fernanda Alves, Paulo Júnior Tadayoshi Nakada, Maria Júlia de Arruda Mazzotti Marques, Leonardo da Cruz Rea, Anelyse Abreu Cortez, Vanessa de Oliveira Arnoldi Pellegrini, Igor Polikarpov, Cristina Kurachi, Complete photodynamic inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm with use of potassium iodide and its comparison with enzymatic pretreatment, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 257, 2024.

[2] Vecchio D. Gupta A. Huang L. Landi G. Avci P. Rodas A., Hamblin M.R. 2015. Bacterial Photodynamic Inactivation Mediated by Methylene Blue and Red Light Is Enhanced by Synergistic Effect of Potassium Iodide. *Antimicrob Agents Chemother* 59.

## Evaluation of Photodynamic Inactivation in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm

Leonardo da Cruz Rea

Maria Júlia de A. M. Marques, Fernanda Alves

Cristina Kurachi

University of São Paulo

leonardocr@usp.br

### Objectives

*Pseudomonas aeruginosa*, a gram-negative bacterium, accounts for 7% of all hospital-acquired infections. Despite advances in medicine and antibiotic therapy, *P. aeruginosa* infection still results in high mortality rates of up to 62% in certain patient groups. This bacteria is also known to form biofilms that could be 10 to 1000 times more resistant to antibiotics compared to their planktonic counterparts. Photodynamic Inactivation (PDI) has been proven to be an effective antimicrobial technique for microbial control. This method involves the incubation of the pathogen with a photosensitizer (PS), then, a light in an appropriate wavelength is applied, leading to the production of reactive oxygen species that are toxic to the microbial cells.

The aim of the present study is to evaluate the effectiveness of PDI against *P. aeruginosa* biofilm in addition of potassium iodide (KI) to the photosensitizer solution, in order to increase the effectiveness of the treatment.

### Materials and Methods

The *P. aeruginosa* strain, ATCC number 27853, was stored at -20°C, and

cultivated on Brain Heart Infusion (BHI) agar plate under incubation at 37 °C for 24 h. Then, the pre-inoculum was prepared transferring 10 colonies in 10 mL of Tryptic Soy Broth (TSB) for 18h (overnight). Next, the inoculum was prepared with 1 mL of the pre-inoculum and 9 mL of fresh TSB, which was incubated for 3 h at 37°C until the bacteria reached the “mid-log” phase or mid-exponential phase of growth. The bacterial suspension was adjusted to a concentration of approximately  $2 \times 10^8$  CFU/mL (optical density between 0.1 and 0.2), in a spectrometer (Cary UV–Vis 50, Varian, version 3.0), at the wavelength of 600 nm.

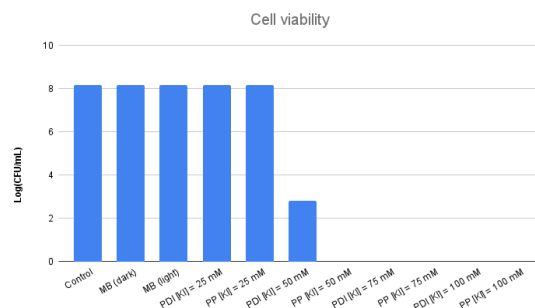
Then, 100 µL was transferred to the 96-well plate that was incubated at 37 °C with a rotation of 75 rpm for 90 min (adhesion phase). After this period, samples were washed twice with 100 µL of saline solution and then incubated with 200 µL of TSB medium for 48 h, for the biofilm maturation. After biofilm formation, samples were washed twice with saline and then incubated for 2 hours with the PS selected previously with the addition of KI at the concentrations of 25, 50, 75 and 100 mM. Then, samples were irradiated at 660 nm, with a fluence of 60 J/cm<sup>2</sup> and an irradiance of 50 mW/cm<sup>2</sup>. Finally, the biofilms were detached by

rubbing the pipette tip on the bottom of the well in different directions (horizontal, vertical and circular) for 30s. Serial dilution was then performed and samples were plated in duplicate on BHI agar medium. The plates were then incubated under aerobic conditions at 37 °C for 24h, followed by the calculation of colony-forming units (CFU/mL). These tests were performed in duplicate on three separate occasions (n = 6).

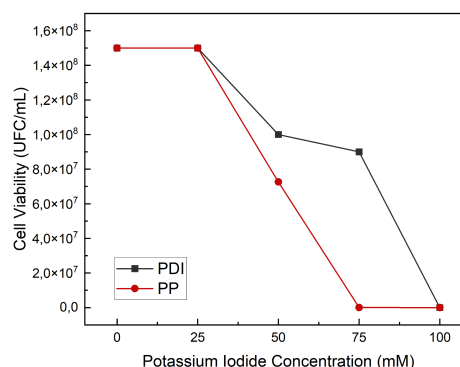
## Results

Previous studies<sup>1</sup> have shown that the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is completely inactivated by the photodynamic reaction using 10 µM MB associated with 100 mM Potassium iodide. Although there are data in the literature showing that the planktonic form of the bacterium is reduced to the point of eradication with different concentrations of KI (1,10,25,50,100 mM)<sup>2</sup>, no study has correlated this variation with the photoproduct and even in biofilms. Therefore, the concentrations of 25, 50 and 75 mM of KI were selected to be tested in biofilms for both the actions of the IFD and the photoproduct.

Iodine photoproducts remain at a sufficient concentration to inhibit bacterial growth. This is due to the fact that reactive iodine species are more stable and have a longer lifespan than reactive oxygen species and singlet oxygen. It can also be seen that the photoproduct performs the inactivation more efficiently. This indicates that the use of photoproducts is promising compared to simply treating the biofilm with antimicrobial photodynamic therapy.



Picture 1: CFU/mL count in each group.



Picture 2: CFU/mL count in each group.

## Conclusions

The efficiency of photodynamic inactivation against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms associated with the inorganic salt KI was demonstrated. There was complete inactivation both via conventional treatment and with the use of iodine photoproducts when using [KI] = 100mM. Partial inactivation occurred between [KI] = 50 and 75 mM, while lower concentrations showed no effect. Inactivation via photoproducts seems to occur more quickly and efficiently.

## Acknowledgements

This work was carried out with the support of the Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior



- Brazil (CAPES) - Funding Code 167630/2023-7.

## References

- [1] Fernanda Alves, Paulo Júnior Tadayoshi Nakada, Maria Júlia de Arruda Mazzotti Marques, Leonardo da Cruz Rea, Anelyse Abreu Cortez, Vanessa de Oliveira Arnoldi Pellegrini, Igor Polikarpov, Cristina Kurachi, Complete photodynamic inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm with use of potassium iodide and its comparison with enzymatic pretreatment, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 257, 2024.
- [2] Vecchio D. Gupta A. Huang L. Landi G. Avci P. Rodas A., Hamblin M.R. 2015. Bacterial Photodynamic Inactivation Mediated by Methylene Blue and Red Light Is Enhanced by Synergistic Effect of Potassium Iodide. *Antimicrob Agents Chemother* 59.