

Título em Português: Inativação fotodinâmica: combinação com ácido láctico para potencialização de efeitos antimicrobianos

Título em Inglês: photodynamic inactivation: combination with lactic acid to enhance antimicrobial effects

Autor: Lucca Ribeiro Paulino

Instituição: Universidade de São Paulo

Unidade: Instituto de Física de São Carlos

Orientador: Kate Cristina Blanco

Área de Pesquisa /
SubÁrea: Radiologia e Fotobiologia

Agência Financiadora: CNPq - PIBIC

Inativação fotodinâmica: combinação com ácido láctico para potencialização de efeitos antimicrobianos

Lucca Ribeiro Paulino*

Jennifer M. Soares, Rebeca Vieira

Orientadora: Kate C. Blanco

Universidade de São Paulo - IFSC, São Carlos

*lucca.ribeiro@usp.br

Objetivos

Devido ao uso indiscriminado de antibióticos nas últimas décadas, infecções hospitalares por bactérias resistentes à antibióticos estão se tornando um problema cada vez mais presente no sistema de saúde global. Além disso, o desenvolvimento de novos antimicrobianos está se tornando economicamente inviável. Em face a esta questão, a inativação fotodinâmica (IFD) [1] e o tratamento com ácido láctico (AL) [2] se apresentam como boas alternativas para o controle antimicrobiano sem o uso dos protocolos tradicionais. Este estudo busca avaliar a interação dos efeitos fotodinâmicos da curcumina com o AL, a fim de entender possíveis efeitos sinérgicos/antagônicos entre os dois mecanismos de ação, visando melhorar a eficácia da IFD.

Métodos e Procedimentos

Cultivo do microrganismo

A bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi primeiramente inoculada em meio nutritivo Brain Heart Infusion ágar (BHI ágar) e incubadas overnight a 37 °C. A partir desta

placa de cultura colônias de *S. aureus* foram coletadas e transferidas para um tubo falcon contendo meio BHI líquido e incubadas num shaker a 37 °C por 18h. Este inóculo foi então centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos e lavado com PBS (tampão fosfato salino). A suspensão foi então padronizada à 10⁸ unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL) pela densidade óptica no comprimento de onda de 600 nm, em um espectrofotômetro UV-Vis para ser utilizada nos experimentos.

Fotodegradação

O experimento de fotodegradação foi realizado utilizando um dispositivo de iluminação LED (Biotable) desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Técnico (LAT, 11 mW/cm², 408 nm), além do UV-Vis (Cary UV-Vis50, Varian) e soluções de curcumina 10 µM com diferentes valores de pH (1.73 à 9.52). Primeiramente foram ajustados os valores de pH desejados de cada solução de curcumina utilizando um pHmetro. A partir do volume total, foi ajustada a concentração de cada grupo para 10 µM de curcumina.

As amostras foram distribuídas em uma placa de 24 poços para serem iluminadas na Biotable (408 nm, 11 mW/cm²). As doses de luz fracionadas aplicadas foram 0 J/cm² à 7.5 J/cm². Após cada tempo de iluminação, as soluções foram transferidas para as cubetas de quartzo para medida do espectro de absorção.

Inativação Fotodinâmica

As soluções de uso da curcumina (fotossensibilizador, FS) e a suspensão padronizada de bactérias foram preparadas conforme o descrito nos itens anteriores. Foram feitos os seguintes grupos controles: geral (bactéria), escuro (bactéria + FS) e luz (bactéria + luz) e o grupo tratamento: IFD (bactéria + FS + luz). Todos os grupos foram incubados à 37 °C por 20 minutos. Os grupos IFD e luz, após incubação, foram irradiados em uma Biotable de 408 nm. Por fim, as amostras foram diluídas e então semeadas em placas de petri e incubadas overnight para contagem de unidades formadoras de colônias.

Resultados

Ao realizar 3 ciclos de iluminação nas soluções de curcumina com o LED de 408 nm conseguimos obter seu espectro de absorção (Figura 1) neste comprimento de onda.

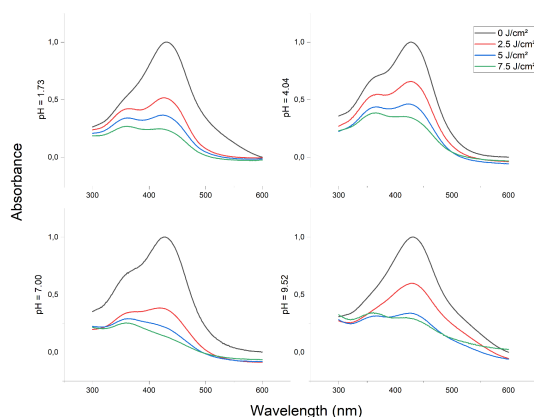


Figura 1 - Fotodegradação da curcumina em luz 408 nm em 4 pH distintos (1.73, 4.04, 7, 9.52).

A partir dele é possível inferir a ocorrência de reações químicas e/ou mudanças no estado de agregação e da conformação das moléculas em solução. Ao analisar os gráficos vemos que há diferenças entre os espectros dependendo do pH da solução, especialmente a presença de um pico menor em 350 nm que indica uma possível diferença no estado de agregação da curcumina antes de ser iluminada, já os novos picos observados após a iluminação são decorrentes da fotodegradação da curcumina em diferentes compostos que irão gerar espectros distintos.

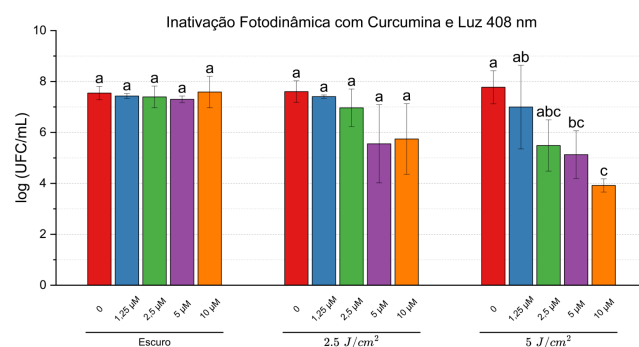


Figura 2 - Inativação fotodinâmica de *S. aureus* com curcumina em diferentes concentrações e doses de luz em 408.

Os grupos controle escuro e claro não apresentaram reduções na carga bacteriana. Nos grupos tratamento IFD, foi obtida as reduções de 1 a 3 log (UFC/ml) com diferença estatisticamente significativa para a dose de luz 5 J/cm².

Conclusões

A exposição da curcumina ao ácido láctico modifica o meio, como alterações no pH. Nossos resultados demonstram que essas alterações impactam a molécula da curcumina podendo favorecer ou desfavorecer a IFD. Nos parâmetros testados foi possível obter uma curva de sobrevivência da bactéria para o próximo passo de realizar o tratamento combinado de IFD em conjunto do AL. Os resultados obtidos até o momento foram promissores.



Referências

[1] 10.1039/b311900a

[2] 10.1007/s00449-019002256-w

Photodynamic inactivation: combination with lactic acid to enhance antimicrobial effects

Lucca Ribeiro Paulino*

Jennifer M. Soares, Rebeca Vieira

Advisor: Kate C. Blanco

University of São Paulo - IFSC, São Carlos

*lucca.ribeiro@usp.br

Objectives

Due to the indiscriminate use of antibiotics in recent decades, hospital-acquired infections caused by antibiotic-resistant bacteria are becoming an increasingly common problem in the global health system. In addition, the development of new antimicrobials is becoming economically unviable. In view of this issue, photodynamic inactivation (PDI) [1] and lactic acid (LA) treatment [2] present themselves as good alternatives for antimicrobial control without the use of traditional protocols. This study aims to evaluate the interaction between the photodynamic effects of curcumin and AL in order to understand possible synergistic/antagonistic effects between the two mechanisms of action, with a view to improving the efficacy of IFD.

Methods and Procedures

Cultivation of the microorganism

The bacterium *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) was first inoculated onto Brain Heart Infusion agar (BHI agar) and incubated overnight at 37 °C. From this

culture plate colonies of *S. aureus* were collected and transferred to a falcon tube containing liquid BHI medium and incubated in a shaker at 37 °C for 18h. This inoculum was then centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes and washed with PBS (phosphate-buffered saline). The suspension was then standardized to 10⁸ colony-forming units per milliliter (CFU/mL) by optical density at a wavelength of 600 nm in a UV-Vis spectrophotometer to be used in the experiments.

Photodegradation

The photodegradation experiment was carried out using an LED lighting device (Biotable) developed by the Technical Support Laboratory (LAT, 11 mW/cm², 408 nm), as well as UV-Vis (Cary UV-Vis50, Varian) and 10 µM curcumin solutions with different pH values (1.73 to 9.52). First, the desired pH values of each curcumin solution were adjusted using a pH meter. From the total volume, the concentration of each group was adjusted to 10 µM of curcumin.

The samples were distributed in a 24-well plate to be illuminated in Biotable (408 nm, 11 mW/cm²). The fractionated light doses applied were 0 J/cm² to 7.5 J/cm². After each illumination time, the solutions were transferred to quartz cuvettes to measure the absorption spectrum.

Photodynamic Inactivation

The solutions for the use of curcumin (photosensitizer, FS) and the standardized suspension of bacteria were prepared as described in the previous sections. The following control groups were made: general (bacteria), dark (bacteria + FS) and light (bacteria + light) and the treatment group: IFD (bacteria + FS + light). All groups were incubated at 37 °C for 20 minutes. After incubation, the IFD and light groups were irradiated at a Biotable of 408 nm. Finally, the samples were diluted and then seeded in petri dishes and incubated overnight to count the colony-forming units.

Results

By illuminating the curcumin solutions with the 408 nm LED for 3 cycles, we were able to obtain its absorption spectrum (Figure 1) at this wavelength.

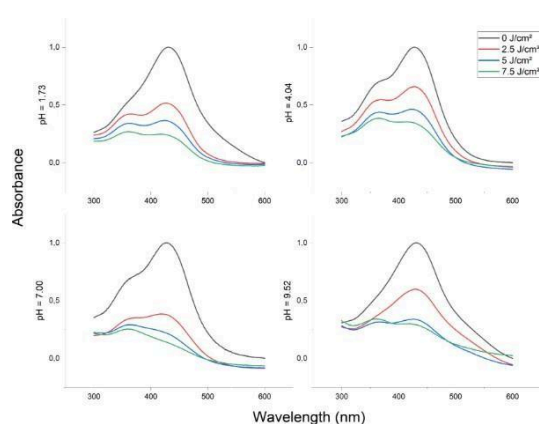


Figure 1 - Photodegradation of curcumin in 408 nm light at 4 different pH (1.73, 4.04, 7, 9.52).

From this it is possible to infer the occurrence of chemical reactions and/or changes in the state of aggregation and conformation of the molecules in solution. By analyzing the graphs we can see that there are differences between the spectra depending on the pH of the solution, especially the presence of a smaller peak at 350 nm which indicates a possible difference in the state of aggregation of curcumin before it was illuminated, while the new peaks observed after illumination are due to the photodegradation of curcumin into different compounds which will generate different spectra.

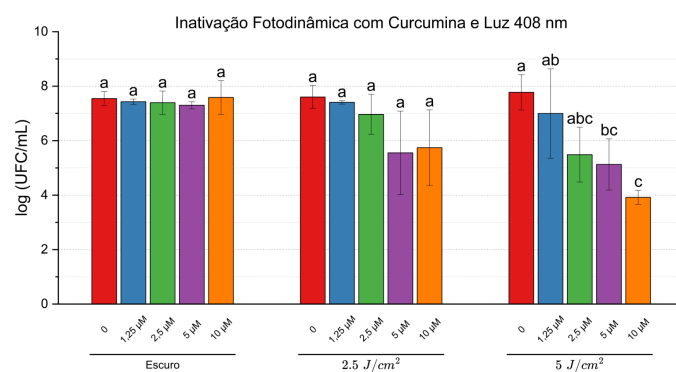


Figure 2 - Photodynamic inactivation of *S. aureus* with curcumin at different concentrations and light doses in 408.

The dark and light control groups showed no reduction in bacterial load. In the IFD treatment groups, reductions of 1 to 3 log (CFU/ml) were obtained, with a statistically significant difference for the 5 J/cm² light dose.

Conclusions

Exposure of curcumin to lactic acid modifies the environment, such as changes in pH. Our results show that these changes have an impact on the curcumin molecule and can favor or disfavor IFD. In the parameters tested, it was possible to obtain a survival curve for the bacteria for the next step of carrying out the combined treatment of IFD together with AL. The results obtained so far have been promising.

References

[1] 10.1039/b311900a

[2] 10.1007/s00449-019002256-w