

**Título em Português:** Efeito Fotodinâmico de uma Nanoemulsão de Porfirina e seus Ligantes na Ausência e Presença do Surfactante Pulmonar

**Título em Inglês:** photodynamic effect of a porphyrin nanoemulsion in the presence and absence of the pulmonary surfactant

**Autor:** Ana Júlia Barbosa Tomé

**Instituição:** Universidade de São Paulo

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

**Orientador:** Cristina Kurachi

**Área de Pesquisa / SubÁrea:** Biofísica Molecular

**Agência Financiadora:** USP - Programa Unificado de Bolsas

## **Efeito Fotodinâmico de uma Nanoemulsão de Porfirina e seus Ligantes na Ausência e Presença do Surfactante Pulmonar**

**Ana Júlia Barbosa Tomé**

**Hilde Harb Buzzá**

**Cristina Kurachi**

Instituto de Física de São Carlos/ Universidade de São Paulo

anajuliabarbosatome@usp.br

### **Objetivos**

A pneumonia é uma das doenças que mais causam mortes no mundo, atingindo principalmente a crianças e idosos [1], sendo a *S. pneumoniae* uma bactéria gram-positiva o principal microrganismo etiológico. Como tratamento, usam-se antibióticos, os quais têm seu efeito mitigado com a emergência de cepas resistentes. Nesse contexto, a Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) aparece como uma alternativa, visto que ainda não há casos de resistência a este tipo de tratamento [3]. Ela consiste em associar luz em um comprimento de onda específico, oxigênio molecular e uma molécula sensível à luz. Quando excitada com luz, essa molécula chamada de fotossensibilizador (FS) consegue mudar seu estado eletrônico para níveis mais excitados e, na volta ao estado fundamental, pode acabar indo para estados meta estáveis e o oxigênio molecular ao reagir com elétrons ou ao receber energia pode então gerar espécies citotóxicas que acabam por causar danos irreparáveis no microrganismo em questão. Esse projeto visa utilizar a terapia fotodinâmica antimicrobiana com o auxílio de uma nanoemulsão de porfirina [2] com e sem ligantes para eliminar microrganismos causadores de pneumonia bacteriana na ausência e na presença do surfactante pulmonar, o qual demonstrou-se ser uma barreira para a interação direta dos fotossensibilizadores com as bactérias em estudo [3].

### **Métodos e Procedimentos**

O microrganismo *S.pneumoniae* foi crescido em meio de cultura BHI por aproximadamente 5 horas em uma estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Afim de verificar se esta já havia atingido sua fase log de crescimento, leu-se a absorbância entre 0,2 e 0,3 no comprimento de onda de 660 nm, que está relacionada a uma contração de 10<sup>8</sup> UFC/mL. As soluções de fotossensibilizador foram obtidas a partir da diluição de uma alíquota da solução estoque e a concentração de microrganismos por experimento sempre foi padronizada em 10<sup>6</sup> UFC/mL. Ao final de cada experimento, com a finalidade de quantificá-lo, todas as soluções passaram pelo método de diluição seriada e plaqueadas em placas de ágar-sangue e as unidades formadoras de colônia que cresceram após 24 horas foram consideradas. Para melhor interpretar estes dados, foram feitos gráficos que permitiram analisar a eficiência da TFDa na presença e na ausência do surfactante pulmonar.

### **Resultados**

A contagem das colônias nas placas de ágar-sangue permitiram quantificar quão eficiente foi a TFDa usando a nanoemulsão de porfirina. A figura 1 mostra que a nanoemulsão de porfirina, não apresenta toxicidade no escuro sobre a *S. pneumoniae*. A figura 2 mostra o panorama de quando a nanoemulsão de porfirina é fotoativada, de maneira que é possível verificar uma redução microbiana de até 6 logs em meio PBS. Na figura 3, a ação da nanoemulsão de porfirina com e sem ligantes (PEG 2 e 5% e

EDTA) é avaliada na presença de PBS ou Survanta (surfactante pulmonar). Neste caso é possível verificar que a presença do *Survanta* interfere negativamente na redução microbiana de maneira que em concentrações iguais de fotossensibilizador há reduções diferentes a depender da presença do surfactante. Quando com ligantes, esperava-se verificar uma maior redução na carga bacteriana que com a nanoemulsão de porfirina livre, o que de fato acontece. É importante notar que uma maior concentração de ligante em contato com a nanoemulsão não implica em uma maior redução microbiana, o que pode ser visto comparando as concentrações de 2 e 5% de PEG.

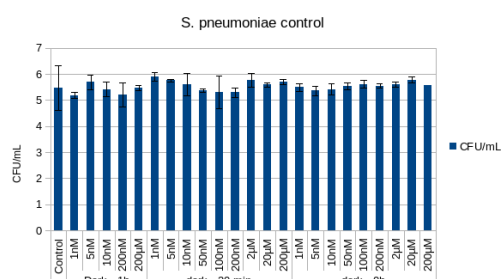


Figura 1: Apresentação da toxicidade no escuro, ou seja a ação, fotossensibilizador na ausência de luz, mostrando que não é tóxico para as bactérias quando não excitado.

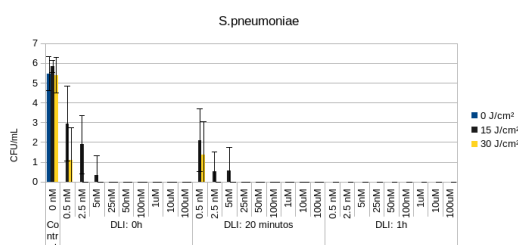


Figura 2: Aplicação da TFDa na ausência do surfactante pulmonar, mostrando que a nanoemulsão de porfirina em PBS, a concentrações na ordem de grandeza de nanomolar, conseguem reduzir até 6 logs de *S.pneumoniae*

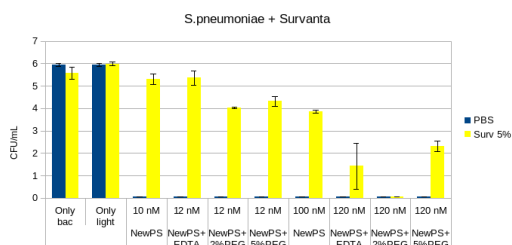


Figura 2: Aplicação da TFDa na presença do surfactante pulmonar, mostrando que a nanoemulsão de porfirina, a concentrações na

ordem de grandeza de nanomolar, conseguem reduzir até 6 logs de *S.pneumoniae* em PBS, mas reduz 4 log na presença do surfactante.

## Conclusões

A nanoemulsão de porfirina mostra-se um bom fotossensibilizador, visto que em concentrações na escala nanomolar consegue reduzir até 6 log de microrganismos em PBS e até 4 log de *S. pneumoniae* em *Survanta*. A presença de ligantes também é uma vantagem a qual colaborou para a redução microbiana, e os resultados dos experimentos *in vitro* mostraram que maiores concentrações de ligantes não necessariamente culminam em uma maior redução microbiana.

## Referências Bibliográficas

- [1]WHO, World Health Organization: Pneumonia. **World Health Organization: WHO**, 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>>. Acesso em: 19 Ago. 2022.
- [2]HOU, Wenxiu; LOU, Jenny W. H.; BU, Jiachuan; *et al.* A Nanoemulsion with A Porphyrin Shell for Cancer Theranostics. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 58, n. 42, p. 14974–14978, .
- [3]KASHEF, Nasim; HAMBLIN, Michael R. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? **Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 31, p. 31–42, 2017.
- [4]KASSAB, Giulia; TOVAR, Johan Sebastian Diaz; SOUZA, Lucas Miguel Pereira; *et al.* Lung surfactant negatively affects the photodynamic



inactivation of bacteria—in vitro and molecular dynamic simulation analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 25, 2022.

## Photodynamic Effect of a Porphyrin Nanoemulsion in the presence and absence of the pulmonary surfactant

**Ana Júlia Barbosa Tomé**

**Hilde Harb Buzzá**

**Cristina Kurachi**

São Carlos Institute of Physics / University of São Paulo

anajuliabarbosatome@usp.br

### Objectives

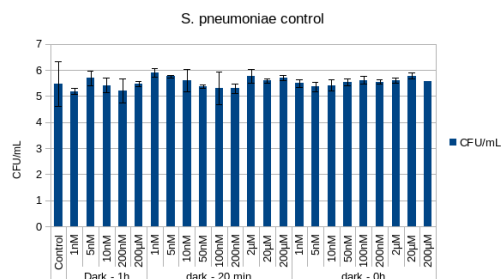
Pneumonia is one of the most deadly diseases in the world, being people under 5 over 60 years old the most affected ones. Antibiotics are used as treatment, but with the emergence of antimicrobial resistance and multi-resistant microorganisms, this type of therapy has its effect lowered. As an alternative to this treatment, Antimicrobial Photodynamic Therapy plays an important role, since no case of resistance against it has been ever reported. This therapy consists in the association of light in a specific wavelength, molecular oxygen and a molecule that is sensitive to light denominated photosensitizer. When illuminated, this molecule goes to higher energy states and, when it comes back to the steady state passing through an intersystem crossing, the FS can go to a metastate called Triplet. From this, the molecule can react with the environment around it (mostly oxygen) and generate reactive oxygen species that are cytotoxic and can, therefore, kill bacteria. This work has the aim to investigate the activity of a porphyrin nanoemulsion and its ligands against *S.pneumoniae*, a gram-positive bacteria that is the leading pathogen of pneumonia. It's known by literature that the lung surfactant inhibits the action of FS. To see whether this therapy works in the presence of the pulmonary surfactant, comparisons were performed to evaluate the antimicrobial efficacy of porphyrin nanoemulsion as a photosensitizer.

### Materials and Methods

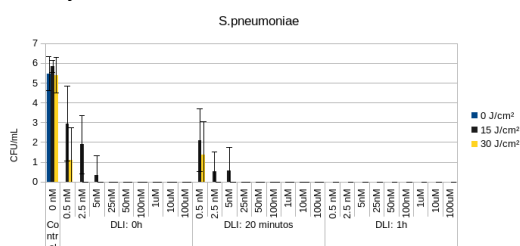
*S.pneumoniae* was grown in BHI media, for approximately 5 hours in an incubator with 5% of CO<sub>2</sub>. To verify whether it was in the log growing phase, optical density at wavelength of 660 nm was verified. If it was between 0.2 and 0.3, it meant that besides log phase, the bacterial concentration was about 10<sup>8</sup> CFU/mL. FS solutions were obtained by dilution of an aliquot of the stock solution and bacterial concentration was patronized to be 10<sup>6</sup> CFU/mL at each test. At the end of the experiment, solutions passed through a serial dilution procedure and then were placed in a blood-agar plate for seeding. After 24 hours, colony forming units were counted and organized in graphs for better analysis of the results.

### Results

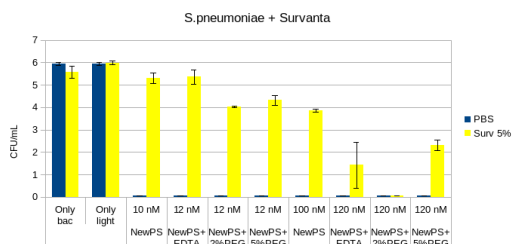
Colony forming units counting allowed the analysis of the effectiveness of the porphyrin nanoemulsion. In Figure 1, it is shown that no toxic effect occurs when the photosensitizer was not irradiated. In Figure 2, the photodynamic effect can be seen by the log reduction, and a complete eradication of *S. pneumoniae* occurs at a nanomolar order of magnitude. In Figure 3, groups are in the presence of *Survanta*, and log reduction was from 6 log in the presence of PBS (absence of *Survanta*), and 4 logs in the presence of *Survanta*, what allow us to conclude that the pulmonary surfactant also inhibits the photodynamic action of the porphyrin nanoemulsion.



Picture 1: Dark control of *S.pneumoniae*, showing that, when not activated by light, there is not photodynamic action.



Picture 2: Inactivation of *S.pneumoniae* in absence of *Survanta*.



Picture 3: Inactivation of *S.pneumoniae* in the presence and the absence of *Survanta* and the comparison of the effect of different ligands.

## Conclusions

Porphyrin nanoemulsion is a promising photosensitizer, seen that nanomolar concentrations were enough to kill 6 log of *S. pneumoniae* in the presence of PBS and 4 log reduction of the same bacteria in the presence of *Survanta*. Ligands enhanced the photodynamic effect of the nanoemulsion in the presence of the pulmonary surfactant. An important observation is that the increase of the ligands concentration does not necessarily interfere positively in the bacterial reduction, as can be seen by (2 and 5%PEG), and, the

presence of ligands brought better results than the free nanoemulsion. Finally, the lung surfactant acts as a barrier that interferes in the FS interaction to microorganisms colonizing the lung.

## References

- [1]WHO, World Health Organization: Pneumonia. World Health Organization: WHO, 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>>. Acesso em: 19 Ago. 2022.
- [2]HOU, Wenxiu; LOU, Jenny W. H.; BU, Jiachuan; et al. A Nanoemulsion with A Porphyrin Shell for Cancer Theranostics. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 58, n. 42, p. 14974–14978, .
- [3]KASHEF, Nasim; HAMBLIN, Michael R. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy, v. 31, p. 31–42, 2017.
- [4]KASSAB, Giulia; TOVAR, Johan Sebastian Diaz; SOUZA, Lucas Miguel Pereira; et al. Lung surfactant negatively affects the photodynamic inactivation of bacteria—in vitro and molecular dynamic simulation analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 119, n. 25, 2022.