

Trabalho



Título em Português:	Estudo da interferência da temperatura na incubação de fotossensibilizadores - uma análise comparativa entre Gram positiva e Gram negativa.
Título em Inglês:	Study of the interference of temperature in the incubation of photosensitizers - a comparative analysis between Gram positive and Gram negative.
Autor:	Letícia Bueno Vissolli
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:	USP - Programa Unificado de Bolsas



Estudo da interferência da temperatura na incubação de fotossensibilizadores - uma análise comparativa entre Gram positiva e Gram negativa

com Leticia Bueno Vissolli

Thalita Hellen Nunes Lima

Kate Cristina Blanco

Universidade de São Paulo - Instituto de Física de São Carlos

leticia_bueno@usp.br

Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da curcumina como um fotossensibilizador na fotoinativação da *E. coli* e *S. aureus* sob diferentes condições de internalização.

Métodos e Procedimentos

Preparo das amostras: Os experimentos realizados foram utilizados as cepas *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923), mantidas em estoque congelado em Caldo BHI com 20% de glicerol. Para o preparo do inóculo, 40 µL do estoque foram adicionados a 4 mL de caldo BHI fresco e incubados a 37 °C por 24h em agitador orbital a 150 rpm. Após o crescimento, a suspensão bacteriana foi diluída em PBS salina para atingir a concentração de 3×10^8 UFC/mL.

Processo de internalização: Em seguida, 250 µL desta suspensão foi combinado com 250 µL de solução de curcumina (CUR) nas concentrações de 80, 8, 0,8 e 0,08 µM, resultando em concentrações finais de 40, 4, 0,4 e 0,04 µM, respectivamente.

Plaqueamento: Após a internalização, 500 µL de cada amostra serão distribuídos em microplacas de 24 poços, separados em grupo irradiado e controle (não irradiado). O grupo irradiado foi exposto a luz LED de 450 nm com

dose de 50 J/cm². Em seguida, foram realizadas diluições seriadas de ambas os grupos. A partir da diluição 1:10⁷, 10 µL de cada amostra serão semeados em placas com Ágar BHI e incubados a 37 °C por 24 h. O crescimento bacteriano foi avaliado mediante contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas com repetições independentes.

Resultados

A eficácia da IFD variou conforme a temperatura de internalização e as características estruturais das bactérias *S. aureus* (Gram-positiva), que apresentou maior sensibilidade ao tratamento em todas as condições, enquanto *E.coli* (Gram-negativa) mostrou ser mais resistente ao tratamento.

Na temperatura de 25°C, observou-se que *S. aureus* sofreu redução superior à 7 na escala logarítmica da viabilidade bacteriana nas concentrações de 40 µM, aproximando-se da eliminação total, atribuída à maior permeabilidade de sua parede espessa de peptidoglicano[1]. Já, *E. coli* apresentou resposta limitada, com redução de apenas 0,6 na escala logarítmica nas concentrações de 4 e 40 µM, devido à barreira adicional da membrana externa, característica de bactérias Gram-negativas [2].

A 30°C, *S. aureus* manteve alta eficácia de inativação, particularmente nas concentrações mais elevadas. Em contrapartida, *E. coli* apresentou apenas melhora na internalização da curcumina, mantendo eficiência reduzida da IFD, em concordância, com estudos que relacionam com temperaturas subótimas à menor permeabilidade membranar[3,4]. O máximo de eficácia foi alcançado a 37°C, quando ambas as espécies apresentaram drástica redução no número de UFC/mL, evidenciando que temperaturas fisiológicas favorecem a permeabilidade e a internalização da curcumina [3,4]. Nesse cenário, *S. aureus* atingiu níveis próximos à esterilização completa, enquanto a *E. coli* atingiu redução máxima de 1,5 na escala logarítmica em 40 µM. Em todas as condições experimentais, os grupos controle (não irradiados) mantiveram o crescimento bacteriano inalterado, confirmando que a inativação observada é dependente da luz, FS e temperatura.

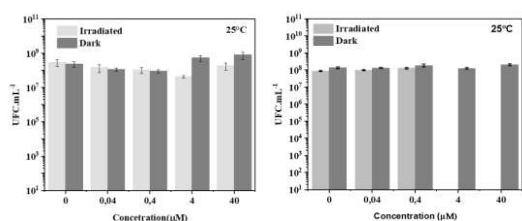


Figura 1 e 2: Resultados do crescimento em UFC.mL⁻¹ da bactéria *E.coli* (rosa) e *S.aureus*(azul) após a realização do IFD com 25°C de temperatura de incubação e irradiação de 450 nm e dose de 50 J.cm⁻²

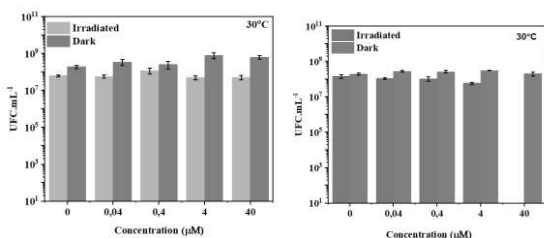


Figura 3 e 4: Resultados do crescimento em UFC.mL⁻¹ da bactéria *E.coli* (rosa) e *S.aureus* (azul) após a realização do IFD com 30°C de temperatura

d incubação e irradiação de 450 nm e dose de 50 J.cm⁻²

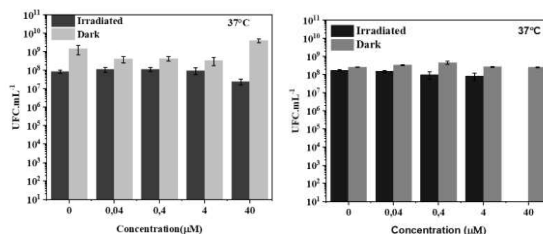


Figura 5 e 6: Resultados do crescimento em UFC.mL⁻¹ da bactéria *E.coli*(rosa) e *S.aureus*(azul) após a realização do IFD com 37°C de temperatura

Conclusões

Os resultados confirmam que a eficácia da IFD é dependente da interação entre temperatura, concentração do FS e características celulares das bactérias. Temperaturas mais elevadas (37°C) potencializam a internalização da curcumina e a geração de EROs, sendo críticas para a inativação de bactérias Gram-negativas como *E. coli*. Já *S. aureus* mostrou-se altamente vulnerável mesmo em condições menos favoráveis, reforçando o potencial da curcumina como agente antimicrobiano versátil, desde que os parâmetros sejam otimizados. Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

- [1] Moreira, José Luciano Bezerra; Carvalho, Cibele Barreto Mano; Frota, C. C. *Visualização de Bactérias e Colorações*. (Imprensa Universitária, 2015).
- [2] Alberts, B. *et al. Biologia Molecular Da Célula. Biologia Molecular da Célula* (2017).
- [3] Katz, C. *et al. Temperature-dependent proteolysis as a control element in Escherichia coli metabolism. Res Microbiol* **160**, 684–686 (2009).
- [4] Schulte, P. M. The effects of temperature on aerobic metabolism: Towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. *Journal of Experimental Biology* vol. 218 1856–1866 Preprint at <https://doi.org/10.1242/jeb.118851> (2015)

Study of the interference of temperature in the incubation of photosensitizers - a comparative analysis between Gram positive and Gram negative.

Leticia Bueno Vissolli

Thalita Hellen Nunes Lima

Kate Cristina Blanco

University of São Paulo - São Carlos Institute of Physics

Leticia_bueno@usp.br

Objectives

The main objective of this work was to evaluate the potential of curcumin as a photosensitizer in the photo-inactivation of *E. coli* and *S. aureus* under different internalization conditions.

Materials and Methods

Sample preparation: The experiments were carried out using *E. coli* (ATCC 25922) and *S. aureus* (ATCC 25923) strains, maintained as frozen stocks in BHI broth supplemented with 20% glycerol. For inoculum preparation, 40 μ L of the stock culture were transferred into 4 mL of fresh BHI broth and incubated at 37 °C for 24 h in an orbital shaker at 150 rpm. Following growth, the bacterial suspension was diluted in saline PBS to achieve a concentration of 3×10^8 CFU/mL.

Internalization process: Subsequently, 250 μ L of this suspension was combined with 250 μ L of curcumin (CUR) solution at concentrations of 80, 8, 0.8, and 0.08 μ M, yielding final concentrations of 40, 4, 0.4, and 0.04 μ M, respectively.

Plating: After internalization, 500 μ L of each sample was distributed into 24-well microplates, divided into an irradiated group and a non-

irradiated control group. The irradiated group was exposed to 450 nm LED light at a dose of 50 J/cm². Serial dilutions were then performed for both groups. From the 1:10⁷ dilution, 10 μ L of each sample were plated on BHI agar and incubated at 37 °C for 24 h. Bacterial growth was assessed by colony-forming unit (CFU) counting. All experiments were performed in triplicate with independent repetitions.

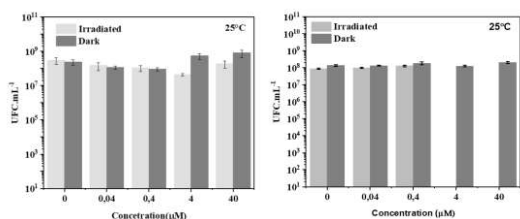
Results

The effectiveness of PDI varied according to the internalization temperature and the structural characteristics of the bacteria. *S. aureus* (Gram-positive) exhibited greater sensitivity to the treatment under all conditions, whereas *E. coli* (Gram-negative) proved to be more resistant.

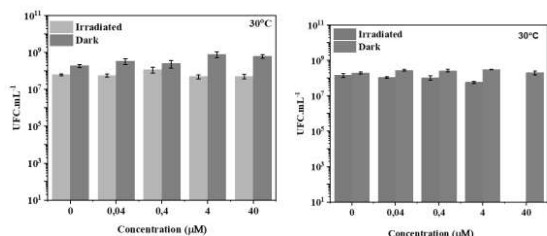
At 25°C, it was observed that *S. aureus* suffered a reduction greater than 7 on the logarithmic scale of bacterial viability at concentrations of 40 μ M, approaching total elimination, which was attributed to the greater permeability of its thick peptidoglycan wall[1]. In contrast, *E. coli* showed a limited response, with a reduction of only 0.6 on the logarithmic scale at concentrations of 4 and 40 μ M, due to the additional barrier of the outer membrane, a characteristic of Gram-negative bacteria[2].

At 30°C, *S. aureus* maintained high inactivation efficacy, particularly at higher concentrations. Conversely, *E. coli* showed only an improvement in curcumin internalization, while maintaining reduced aPDT efficiency, consistent with studies linking suboptimal temperatures to lower membrane permeability[3,4].

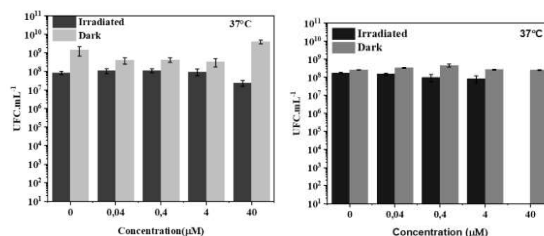
Maximum efficacy was achieved at 37°C, when both species showed a drastic reduction in the number of CFU/mL, demonstrating that physiological temperatures favor permeability and curcumin internalization[3,4]. In this scenario, *S. aureus* reached levels close to complete sterilization, while *E. coli* reached a maximum reduction of 1.5 on the logarithmic scale at 40 µM. Under all experimental conditions, the control groups (non-irradiated) maintained unchanged bacterial growth, confirming that the observed inactivation is dependent on light, photosensitizer, and temperature.



Picture 1 and 2: Growth results (CFU·mL⁻¹) of *E. coli* (pink) and *S. aureus* (blue) following PDI treatment at 25 °C incubation temperature with 450 nm irradiation and a light dose of 50 J·cm⁻².



Picture 3 and 4: Growth results (CFU·mL⁻¹) of *E. coli* (pink) and *S. aureus* (blue) following PDI treatment at 30 °C incubation temperature with 450 nm irradiation and a light dose of 50 J·cm⁻².



Picture 5 and 6: Growth results (CFU·mL⁻¹) of *E. coli* (pink) and *S. aureus* (blue) following PDI treatment at 37 °C incubation temperature with 450 nm irradiation and a light dose of 50 J·cm⁻².

Conclusions

The results confirm that the efficacy of PDI depends on the interaction between temperature, PS concentration, and bacterial cellular characteristics. Higher temperatures (37 °C) enhance curcumin internalization and ROS generation, which are critical for the inactivation of Gram-negative bacteria such as *E. coli*. In contrast, *S. aureus* proved to be highly susceptible even under less favorable conditions, reinforcing the potential of curcumin as a versatile antimicrobial agent, provided that the parameters are properly optimized.

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] MOREIRA, José Luciano Bezerra; CARVALHO, Cibele Barreto Mano; FROTA, C. C. *Visualization of Bacteria and Staining*. Fortaleza: University Press, 2015.
- [2] ALBERTS, B. et al. *Molecular Biology of the Cell*. 6th ed. New York: Garland Science, 2017.
- [3] KATZ, C. et al. Temperature-dependent proteolysis as a control element in *Escherichia coli* metabolism. *Research in Microbiology*, v. 160, p. 684–686, 2009.
- [4] SCHULTE, P. M. The effects of temperature on aerobic metabolism: Towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. *Journal of Experimental Biology*, v. 218, p. 1856–1866, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.118851>