

AVALIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM CORANTES XANTENOS EM PATÓGENOS DE ORIGEM ALIMENTAR

Leonardo Henrique Ribeiro (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Jane Martha Graton Mikcha (Orientador), e-mail: leonardo.hlribeiro@me.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde / Maringá, PR.

Ciência e Tecnologia de Alimentos, Microbiologia de Alimentos

Palavras-chave: terapia fotodinâmica, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*.

Resumo:

A contaminação dos alimentos por micro-organismos patogênicos é uma preocupação global e pode trazer consequências indesejáveis tanto para o setor produtivo quanto para a saúde. Os métodos tradicionalmente utilizados no controle do desenvolvimento microbiano em alimentos nem sempre são efetivos, não podem ser aplicados a qualquer tipo de alimento, além de poderem causar alterações nas características dos mesmos. A utilização de novas tecnologias eficazes são um desafio na produção de alimentos microbiologicamente seguros. Desta forma, um método promissor é a terapia fotodinâmica, apresenta bom custo benefício e é ecologicamente correta. O presente trabalho avaliou o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica utilizando corantes xantenos (Rosa de Bengala, Eritrosina B e Eosina Y) expostos à luz LED verde em patógenos de origem alimentar (*Staphylococcus aureus* e *Salmonella Typhimurium*). As suspensões bacterianas foram tratadas com diferentes concentrações dos fotossensibilizadores e iluminadas com LED verde por 5, 10 e 15 minutos. A viabilidade celular foi determinada por meio de contagem de colônias e os grupos tratados foram comparados ao controle. *S. aureus* foi mais sensível à inativação fotodinâmica mediada pelos corantes xantenos. Eritrosina B e eosina Y não reduziram significativamente as contagens de *S. Typhimurium*, enquanto rosa bengala foi efetivo em inativar as duas bactérias avaliadas. A inativação fotodinâmica pode ser uma alternativa promissora no controle bacteriano na área de alimentos.

Introdução

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) resultam em altas taxas de morbidade e mortalidade, significativas perdas econômicas e ainda são consideradas um problema de saúde pública em todo o mundo (WHO, *online*, 2016). No Brasil, *Salmonella* spp. e *S. aureus* foram os principais responsáveis pelos surtos de doenças transmitidas por alimentos no período de 2000 a 2015, sendo responsáveis por 35,08% e 18,38%, respectivamente, dos agentes identificados (BRASIL, 2015).

O desenvolvimento e aplicação de novas técnicas para o controle de micro-organismos é necessário. Dentre as várias metodologias existentes, a terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica promissora para o controle de micro-organismos em alimentos. A técnica consiste no uso de uma substância fotossensibilizadora (FS) e aplicação de luz na presença de oxigênio. Esta reação gera espécies reativas de oxigênio que induzem danos celulares e inativam os micro-organismos (PERUSSI, 2007; LUKSIENE et al., 2010). Dentre os compostos que apresentam propriedades fotossensibilizantes, estão os corantes xantenos Rosa de Bengala, Eosina Y e Eritrosina B tem alta produção de oxigênio singlete e baixo custo.

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação fotodinâmica dos corantes xantenos Rosa de Bengala, Eritrosina B e Eosina Y sobre *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Typhimurium*.

Materiais e métodos

Fotossensibilizador e fonte de luz

As soluções estoque dos corantes xantenos (Rosa de bengala, Eritrosina B e Eosina Y) foram preparados pelo Núcleo de Pesquisas em Sistemas Fotodinâmicos – UEM. Foi utilizado um sistema de luz LED (light-emitting diodes; 0,5W - LED T10 4SMD) com emissão de luz verde.

Isolados bacterianos e condições de cultura

Staphylococcus aureus ATCC 25923 e *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium ATCC 14028 estavam estocadas a -20 °C em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) suplementado com 20% (vol/vol) de glicerol no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá.

As bactérias foram cultivadas em caldo BHI a 37 °C *overnight*, centrifugadas, lavadas e ressuspensas em solução salina 0.85%. O inóculo foi padronizado em espectrofotômetro a 580 nm (%Transmitância de 25 a 30%) e diluído a uma concentração correspondente a 10⁷ Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL para uso nos testes de inativação fotodinâmica.

Inativação fotodinâmica de S. aureus e S. Typhimurium

Cinquenta microlitros das suspensões bacterianas padronizadas (10⁷ UFC/ mL) foram homogeneizados com 950 µL das soluções dos fotossensibilizadores em diferentes concentrações e mantidos ao abrigo da luz por 10 min. Em seguida, uma alíquota de 500 µL foi iluminada com LED por 5, 10 e 15 minutos. As amostras foram diluídas em solução salina 0.85%, semeadas em *Agar Trypticase Soy* (TSA) e incubadas a 37 °C por 24 horas.

A redução da viabilidade celular foi determinada pela diferença da contagem de UFC/mL entre o grupo tratado e controle (suspensão bacteriana + tampão fosfato-salina).

Análise estatística

Os testes foram realizados em triplicata com três repetições independentes. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão e serão submetidos à análise de variância (ANOVA) com nível de 5% de significância, e as médias comparadas pelo Teste de Tukey.

Resultados e Discussão

Os fotossensibilizadores na ausência de luz e a exposição da bactéria ao LED sem o PS não tiveram efeito na viabilidade bacteriana.

O tratamento de *S. Typhimurium* com eosina Y nas concentrações de 0,5; 5 e 10 μM reduziu as contagens bacterianas em até 1,7 log/UFC. No entanto os resultados não foram significativos em comparação com o controle nos três tempos de iluminação avaliados. Para *S. aureus* o tratamento com eosina Y a 5 μM causou total fotoinativação da bactéria no menor tempo de iluminação avaliado (5min). A combinação de 15min de iluminação e eosina Y a 0,5 e 1,0 μM reduziu as contagens bacterianas em 2,5 e 3 log/UFC ($p < 0,05$), respectivamente.

O tratamento com rosa bengala a 75 μM e 5 minutos de iluminação inativou completamente a população de *S. Typhimurium*. O mesmo resultado foi obtido com 50 μM e 15 minutos de iluminação. *S. aureus* tratado com de rosa bengala a 25 μM foi totalmente inativado após 5 minutos de iluminação.

No tratamento de *S. aureus* com eritrosina B, as contagens de UFC foram zeradas no tempo de 15 minutos nas concentrações de 100, 250 e 500 nM. O tratamento com 500 nM também foi capaz de inativar completamente a população bacteriana com 5 e 10 minutos de iluminação.

Porém, *S. Typhimurium* quando tratada com eritrosina B, assim como com eosina Y, não apresentou reduções significativas quando comparados com o controle.

Em geral as bactérias Gram negativas são mais resistentes à inativação fotodinâmica. Esta resistência pode ser atribuída a difenretes estruturas e composição da parede celular que é o principal alvo desta técnica (ALVES et al., 2015).

Conclusões

O presente estudo demonstrou que a inativação fotodinâmica com os fotossensibilizadores eosina Y, eritrosina B, rosa bengala e luz de LED verde foi eficaz na redução das contagens de bactérias de origem alimentar. A bactéria mais susceptível ao tratamento fotodinâmico foi *S. aureus*, e rosa bengala foi o fotossensibilizador mais efetivo, sendo capaz de inibir as duas bactérias avaliadas. A inativação fotodinâmica pode ser uma alternativa promissora no controle bacteriano na área de alimentos.

Agradecimentos

Agradeço à minha família e amigos, colegas de laboratório, e, especialmente, à minha orientadora Prof^a Dr^a Jane, que me deu todo suporte necessário para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço, também, à CAPES e a UEM pela oferta da bolsa durante o decorrer deste projeto.

Referências

ALVES, E.; FAUSTINO. M. A. F.; NEVES, M. G. P.M.S.; CUNHA, A.; NADAIS, H.; ALMEIDA, A (2015). **Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope.** Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews, 22 (2015), 34 – 57.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. Disponível em: www.saude.gov.br/svs; (Acesso em 16 de Janeiro de 2015).

LUKSIENE, Z.; BUCHOVEC, I.; PASKEVICIUTE, E. (2010). **Inactivation of *Bacillus cereus* by Nachlorophyllin-based photosensitization on the surface of packaging.** Journal of Applied Microbiology, 109, 1540 – 1548.

PERUSSI, J.R. (2007). **Inativação fotodinâmica de microrganismos.** Química Nova, 30, 988 – 994.

WHO. **Food safety and foodborne illness, n°237.** World Health Organization, 2007. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>, acesso em: 29. Mar. 2016.