

AVALIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR EOSINA Y EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

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

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

Ciência e tecnologia de alimentos, Microbiologia de Alimentos.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica, biofilme, eosina Y.

Resumo:

As doenças transmitidas por alimentos constituem um problema crescente de saúde pública em todo o mundo. A eliminação de microrganismos causadores dessas doenças se torna ainda mais difícil devido à sua capacidade de formação de biofilmes. 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. Desta forma, um método promissor é a terapia fotodinâmica, que apresenta bom custo benefício e é ecologicamente correta. O presente trabalho avaliou o efeito da terapia fotodinâmica utilizando eosina Y exposta à luz LED verde em *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Typhimurium*. Nos ensaios com células planctônicas as suspensões bacterianas expostas a diferentes concentrações de eosina Y foram iluminadas por 5, 10 e 15 minutos. Para a inativação fotodinâmica dos biofilmes, os mesmos foram formados por 24h e iluminados por 30 minutos com diferentes concentrações de eosina Y. O tratamento reduziu as contagens de células planctônicas e de biofilmes de *S. aureus* e *S. Typhimurium*. 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). Bactérias e vírus são os principais agentes de DTA, dentre eles *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. são os mais prevalentes. No Brasil, *Salmonella* spp. e *S. aureus* foram os principais responsáveis pelos surtos de DTA entre 2000 a 2015, sendo responsáveis por 35,08% e 18,38%, respectivamente, dos agentes identificados (BRASIL, 2015).

A eliminação de microrganismos na produção de alimentos é difícil, principalmente devido à sua capacidade de formação de biofilmes. Patógenos de origem alimentar que formam biofilmes em superfícies de

contato com alimentos aumentam o potencial de contaminação cruzada (BRIDIER et al., 2015; CAPITELLI et al., 2014).

O desenvolvimento e aplicação de novas técnicas para o controle de microrganismos na área alimentar é necessário. Uma alternativa aos métodos tradicionais de controle microbiano que vem sendo estudada é a terapia fotodinâmica (TFD). Essa técnica consiste no uso de uma fonte de luz visível, oxigênio molecular e um fotossensibilizador (FS), que é capaz de absorver e transferir a energia da iluminação para o oxigênio molecular levando a formação de espécies altamente citotóxicas (ALVES et al., 2015). Dentre os compostos que apresentam propriedades fotossensibilizantes, o corante Eosina Y, vem sendo amplamente estudado. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação fotodinâmica de eosina Y contra células planctônicas e biofilmes de *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium e *Staphylococcus aureus*, iluminados com LED verde.

Materiais e métodos

Fotossensibilizador, fonte de luz e isolados bacterianos

As soluções estoque do corante 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.

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.

Inativação fotodinâmica de células planctônicas

As bactérias foram cultivadas em caldo BHI a 37 °C *overnight*, centrifugadas, lavadas e ressuspendidas em solução salina 0.85%. O inóculo foi padronizado em espectrofotômetro a 580 nm (%Transmitância de 25 a 30%) e diluído a para se obter 10^7 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL.

Cinquenta microlitros das suspensões bacterianas padronizadas foram homogeneizados com 950 µL das soluções de Eosina Y, em diferentes concentrações, e mantidos ao abrigo da luz por 10 min. Em seguida, 500 µL foram iluminados 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 o grupo controle.

Como controles foram avaliadas também as contagens para os grupos contendo: apenas a eosina Y na ausência de luz (controle do FS) e exposição das suspensões bacterianas ao LED (controle de luz).

Inativação fotodinâmica de biofilmes

Foi adicionado o inóculo bacteriano (10^7 UFC/mL) em microplacas de 24 poços e incubado a 37 °C por 24 h. Após a formação do biofilme os poços foram lavados com solução salina 0,85% estéril, expostos a várias concentrações de eosina Y, em ausência de luz, durante 30 minutos e, em

seguida, foram expostos à iluminação com LED verde por 30 minutos. Foi incluído o experimento controle da formação de biofilme sem FS e sem iluminação. Após a iluminação o conteúdo dos poços foi aspirado, lavados com solução salina 0,85% estéril e submetidos a banho de ultra som a 25 Hz por 5 min (Ultra Cleaner 750A, Unique). Foram realizadas diluições seriadas e semeadas em Ágar Muller- Hinton (MHA) (Difco™) e então, incubadas a 37 °C por 24 h. Os resultados foram expressos em log UFC/cm².

Resultados e Discussão

Nos ensaios realizados como controles apenas a eosina Y na ausência de luz (controle do FS) e a exposição das suspensões bacterianas ao LED (controle de luz) não tiveram efeito sobre a viabilidade bacteriana em comparação com o controle positivo (bactérias e PBS).

Para as células planctônicas de *S. Typhimurium* foram testadas as concentrações de 0,5, 5,0 e 10,0 µmol.L⁻¹ de eosina Y. O tratamento reduziu as contagens bacterianas em até 1,7 log UFC/mL. As maiores reduções foram observadas aumentando a concentração do fotossensibilizador e o tempo de iluminação. As contagens bacterianas foram significativamente reduzidas (p <0,05) com eosina Y a 10,0 µmol.L⁻¹ em todos os tempos de irradiação e 5,0 µmol.L⁻¹ iluminadas por 10 e 15 min (Figura 1).

Em células planctônicas de *S. aureus* o uso da eosina Y nas concentrações (0,1, 0,25, 0,5, 1,0 e 5,0 µmol.L⁻¹) e tempos de iluminação avaliados reduziu significativamente o número de UFC/mL quando comparado com o controle. O tratamento com fotossensibilizador a 5,0 µmol.L⁻¹ causou total fotoinativação da bactéria no menor tempo de iluminação avaliado (5min). As maiores reduções foram obtidas com a combinação de 15 min de iluminação e eosina Y nas concentrações de 0,5 e 1,0 µmol.L⁻¹, onde se obteve reduções de 2,5 e 3 log/UFC, respectivamente (Figura 1).

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

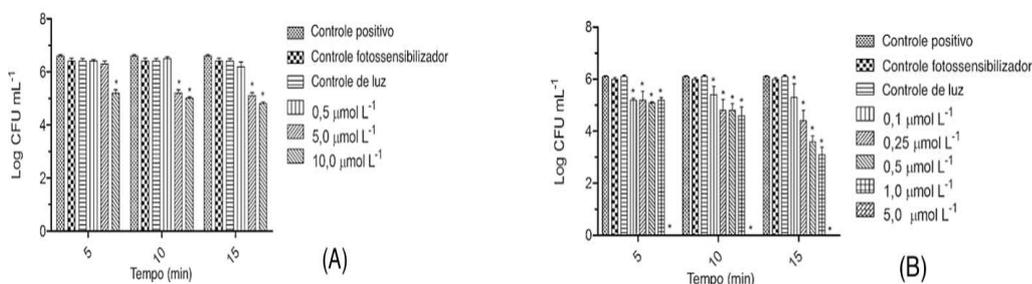


Figura 1 – Inativação fotodinâmica mediada por eosina Y sobre células planctônicas de *S. Typhimurium* (A) e *S. aureus* (B). Controle positivo (bactéria e PBS sem iluminar); Controle do Fotossensibilizador (bactéria e fotossensibilizador sem iluminar) e Controle de luz (bactéria exposta à luz sem fotossensibilizador). *Diferem significativamente.

Para os ensaios contra biofilme de *S. Typhimurium* foi observada uma redução de aproximadamente 1,5 log UFC/cm² nas três concentrações de eosina Y testadas (600, 800 e 1000 µmol.L⁻¹) quando comparadas com o controle. As concentrações de 200, 400, 600, 800 e 1000 µmol.L⁻¹ de eosina Y foram testadas contra o biofilme de *S. aureus*, e foram observadas reduções, quando comparadas ao controle, de aproximadamente 2 log UFC/cm².

Conclusões

O presente estudo demonstrou que a inativação fotodinâmica com LED e eosina Y foi efetiva contra *S. aureus*, no entanto, *S. Typhimurium*, assim como os biofilmes, foram mais resistentes ao tratamento. A inativação fotodinâmica pode ser uma alternativa promissora no controle bacteriano na área de alimentos, principalmente contra bactérias Gram positivas.

Agradecimentos

Agradeço à minha família, amigos, e 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).

BRIDIER, A., SANCHES-VIZUETE, P., GUILBAUD, M., PIARD, L.-C., NAÏTALI, M., BRIANDET, R. **Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens.** *Food Microbiology*, 45 (2015): 167-178.

CAPPITELLI F, POLO A, VILLA F. **Biofilm formation in food processing environments is still poorly understood and controlled.** *Food Engineering Reviews*. 6 (2014), 29–42.

WHO. **Food safety and foodborne illness**, nº237. World Health Organization, 2007. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>, acesso em: 29. Mar. 2016.