

ASSOCIAÇÃO DE IODETO DE POTÁSSIO COM CORANTES XANTENOS NA TERAPIA FOTODINÂMICA EM *Salmonella* TYPHIMURIUM NA FORMA PLANCTÔNICA

Felipe Gutierrez Tormena (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Jane Martha Graton
Mikcha (Orientadora), e-mail: jmgmikcha@uem.br

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

**Ciência e tecnologia de alimentos (50700006) / Microbiologia de
alimentos (50701037)**

Palavras-chave: Iodeto de potássio, corantes xantenos, *Salmonella*
Typhimurium

Resumo:

Com consequências indesejáveis tanto para o setor produtivo quanto para a saúde, a contaminação dos alimentos por micro-organismos patogênicos é uma preocupação global. Como estratégia de controle microbiológico destes alimentos alguns métodos são tradicionalmente utilizados, envolvendo a utilização de substâncias químicas, e também métodos físicos, que nem sempre são efetivos, não podem ser aplicados a qualquer tipo de alimento, além de causarem alterações nas características organolépticas dos mesmos. Sendo assim, existe uma crescente procura por novas tecnologias eficazes na produção de alimentos microbiologicamente seguros, que tenham custo reduzido e sejam ecologicamente corretas. Desta forma, um método promissor é a terapia fotodinâmica, que se baseia na utilização de uma substância que atua como corante sensível à luz visível (fotossensibilizador), a qual sob irradiação ocasiona a formação de espécies reativas de oxigênio, que são tóxicas aos micro-organismos. Porém os corantes sozinhos nem sempre são totalmente eficazes, portanto uma alternativa possível é a utilização de sais que potencializem a ação desses fotossensibilizadores. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da terapia fotodinâmica utilizando a associação do sal iodeto de potássio com os corantes xantenos (Rosa bengala e Eosina Y) expostos à luz LED de cor verde contra células planctônicas de *Salmonella* Typhimurium.

Introdução

Significativas perdas econômicas, altas taxas de morbidade e mortalidade são gerados pelas doenças transmitidas por alimentos (DTAs) e, apesar dos esforços realizados para preveni-las, elas ainda são consideradas um problema de saúde pública em todo o mundo (WHO, 2020).

Salmonella spp. está entre os patógenos alimentares mais comuns que afeta milhões de pessoas a cada ano, às vezes com resultados sérios e fatais (AO et al., 2015). No Brasil, cerca de 2,3 milhões de pessoas foram expostas as DTAs no período de 2000 a 2017, onde em mais de 30% dos casos o agente etiológico identificado foi *Salmonella* spp., tornando-a a maior responsável pelos surtos de doenças transmitidas por alimentos no país (BRASIL, 2018).

Uma das ferramentas que pode ser promissora para o controle de micro-organismos em alimentos é a Inativação Fotodinâmica (SILVA et al, 2019). A técnica consiste no uso de uma substância fotossensibilizadora e aplicação de luz visível na presença de oxigênio. Esta reação gera espécies reativas de oxigênio, como oxigênio singlete (O_2), que induzem danos celulares e inativam os micro-organismos (PERUSSI, 2007).

Mais de 400 compostos são reconhecidos atualmente por apresentarem propriedades fotossensibilizantes, dentre eles estão os corantes xantenos Eosina Y (EOS) e Rosa bengala (RB) (SORIA-LOZANO et al., 2015). Porém, alguns estudos indicam que bactérias Gram-negativas se mostram resistentes ao tratamento fotodinâmico com os corantes xantenos (SILVA et al., 2019; BONIN et al., 2018). Sendo assim, os sais inorgânicos, como o iodeto de potássio (KI), vêm se mostrando como potencializador, tanto para bactérias Gram-positivas, quanto para Gram-negativas, melhorando a ação fotodinâmica em alguns micro-organismos, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (HAMBLIN, 2016).

Com base nisso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação fotodinâmica da associação de corantes xantenos com Iodeto de Potássio (KI) sobre células planctônicas de *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium.

Materiais e métodos

Foram preparadas soluções estoques de EOS e RB a uma concentração 1×10^{-4} mol/L em tampão fosfato salino (PBS) a pH 7,4, esterilizada por filtração, normalizada em espectrofotômetro (UV-Vis Beckman Coulter DU*800) com comprimento de onda λ_{max} 517 nm, mantida no escuro sob refrigeração até à utilização.

Utilizou-se como fonte de luz um sistema de luz LED verde (λ_{max} 490-570 nm). Os espectros de emissão foram medidos em Espectrofluorímetro (Cary Eclipse) e a intensidade de luz foi medida utilizando um Medidor Portátil Modelo 407A da Spectra-Physics.

Os testes foram realizados contra a bactéria Gram-negativa: *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium ATCC 14028.

A fotoinativação foi realizada segundo metodologia descrita por Silva et al. (2019) com algumas modificações.

Para os ensaios de fotoinativação, foram utilizados três grupos controle: bactérias e PBS (controle positivo); bactéria e RB ou EOS sem luz (controle do fotossensibilizador) e bactéria exposta ao LED na ausência de fotossensibilizador (controle de luz).

O isolado bacteriano foi cultivado em caldo *Brain Heart Infusion overnigth* a 37 °C, as culturas foram centrifugadas, lavadas três vezes e ressuspensas em solução salina a 0,85%. O inóculo bacteriano foi padronizado num espectrofotômetro VarianCary-Eclipse a 580 nm e diluído em solução salina a 0,85% para uma concentração de 10⁷ Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL. A fotoinativação foi realizada pela adição de 25 µL da suspensão bacteriana (10⁷ UFC/mL) a 475 µL das soluções dos corantes xantenos em concentrações variadas em combinação com KI em microplacas de 24 poços. As amostras foram mantidas ao abrigo da luz durante 10 min e expostas a iluminação por LED verde durante 5, 10 e 15 min. Após a iluminação, as amostras foram diluídas em solução salina a 0,85%, semeadas em Trypticase Soy Agar e incubadas a 37 °C durante 24 horas. A redução na viabilidade celular foi determinada pela diferença nas contagens de UFC/mL entre o grupo tratado e o grupo de controle positivo.

Resultados e Discussão

Foi observada completa inativação bacteriana para as combinações: EOS 0,10 µM + 100 mM KI e EOS 0,10 µM + 50 mM KI; EOS 0,50 µM + 50 mM KI; EOS 0,25 µM + 50 mM KI, após 15 minutos de irradiação. Para as combinações EOS 0,25 µM + 100 mM KI e EOS 0,50 µM + 100 mM KI, não foram recuperadas células viáveis após 10 min e 5 min de irradiação, respectivamente.

Foi possível inativar *S. Typhimurium* em todas as combinações de RB (0,10 µM; 0,25 µM; 0,50 µM) com KI a 100 mM, e tempos de iluminação de 5 e 10min. Quando a concentração de KI foi reduzida (50 mM) foi observada inativação com RB a 0,25 µM e 0,50 µM com 15 e 10 min de iluminação, respectivamente.

Não foi observada redução nas contagens bacterianas nos controles de fotossensibilizador e controle de luz comparados ao controle positivo.

Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, foi possível obter a inativação de *S. Typhimurium* com 5 minutos de iluminação, porém concentração de RB utilizada foi 75 µM (SILVA et al, 2018). Inativação fotodinâmica mediada por EOS (10 µM) e 15 min de iluminação causou uma redução de ~ 1,5 log UFC/mL na população de *S. Typhimurium* (BONIN et al, 2018).

Conclusões

O efeito combinado de EOS com KI contra *S. Typhimurium* mostra que essa combinação foi eficaz na fotoinativação dessa bactéria Gram-negativa, sendo observada fotoinativação total em todas as combinações avaliadas. A associação de KI com RB permitiu reduzir grandemente a concentração do fotossensibilizador, mantendo-se o efeito fotodinâmico. Esses resultados mostram que o KI potencializa o efeito dos corantes xantenos, EOS e RB contra *S. Typhimurium* ATCC 14028. Essa pode ser uma alternativa promissora para o controle de patógenos de origem alimentar incentivando

futuros estudos com o objetivo de tornar possível sua aplicação na indústria alimentícia

Agradecimentos

Agradeço a orientadora Jane Martha Graton Mikcha, ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica promovido pelo CNPq em parceria com a Fundação Araucária e Universidade Estadual de Maringá pela oportunidade.

Referências

- AO, Trong T. et al. Global burden of invasive nontyphoidal *Salmonella* disease, 2010. *Emerging infectious diseases*, v. 21, n. 6, p. 941, 2015.
- BONIN, E. et al. Photodynamic inactivation of foodborne bacteria by eosin Y. *Journal of applied microbiology*, v. 124, n. 6, p. 1617-1628, 2018.
- 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*, 2015. Disponível em: www.saude.gov.br/svs; [Abril 2019]
- HAMBLIN, Michael R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Current opinion in microbiology*, v. 33, p. 67-73, 2016.
- PERUSSI, Janice Rodrigues. Inativação fotodinâmica de microrganismos. *Química Nova*, v. 30, n. 4, p. 988-994, 2007.
- SILVA, A. et al. Antimicrobial photodynamic inactivation mediated by rose bengal and erythrosine is effective in the control of food-related bacteria in planktonic and biofilm states. *Molecules*, 23(9), 2288, 2018.
- SILVA, A. et al. Xanthene dyes and green LED for the inactivation of foodborne pathogens in planktonic and biofilm states. *Photochemistry and photobiology*, v. 95, n. 5, p. 1230-1238, 2019.
- SORIA-LOZANO, P. et al. In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. *BMC microbiology*, v. 15, n. 1, p. 187, 2015.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food safety. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>>. Acesso em: ago. 2020.