

Potencial fototóxico de Riboflavina contra *Escherichia coli*

Gabriel Henrique Viana Bernin (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Rogério Aleson dias Bezerra, Bruna Barnei Saraiva, Katieli da Silva Souza Campanholi, Magali Soares dos Santos Pozza (Orientador). E-mail: msspozza@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Maringá, PR.

Área: 50400002; Sub-área: 50405020.

Palavras-chave: microbiologia do leite, inativação fotodinâmica, conservação de alimentos

RESUMO

O objetivo do trabalho foi determinar *in vitro* o potencial fototóxico da riboflavina contra *Escherichia coli*. Neste sentido, trabalhos vêm sendo desenvolvido utilizando a Riboflavina (7,8-dimetil-10-ribitil-isoaloxazina), uma vitamina hidrossolúvel com coloração amarela pertencente ao complexo vitamínico B₂, como opção de fotosensibilizador (FS). O experimento foi realizado na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), no Laboratório de Análises de Leite pertencente ao Centro Mesorregional de Excelência em Tecnologia do Leite (CMETL). Para a avaliação de composição do leite, foi utilizado o equipamento Multi-Analisador de Leite por Ultrassom (Milk analyser-Asko), calibrado para avaliação de leite cru e UHT, realizadas a cada 3 dias (0, 3, 6 e 9 dias). Na avaliação microbiológica, os efeitos foram significativos para a terapia fotodinâmica ($p < 0,05$). Entretanto não houve efeito para inclusão de Riboflavina ($p > 0,05$). A avaliação da composição do leite demonstrou diferença média de 6,28% entre o tratamento controle e os demais com inclusão de riboflavina na variável gordura. Para a variável Proteína (P) e lactose (L) a inclusão da riboflavina não apresentou efeitos para os tratamentos avaliados ($p = 0,1188$). Na avaliação realizada em fator dos dias, efeitos foram declarados significativos sendo ($p < 0,0006$; $p < 0,0001$) para ambas as variáveis avaliadas proteína e lactose.

INTRODUÇÃO

As bactérias Gram negativas são geralmente mais resistentes a terapia fotodinâmica quando comparadas as bactérias Gram positivas, fato justificado pelas diferenças estruturais na parede celular, uma vez que as bactérias gram negativas possui membrana externa complexa. Esta membrana externa

consiste em uma bicamada lipídica que atua como uma barreira física e funcional entre a célula e o meio ambiente, enquanto as células Gram positivas possuem apenas membranas relativamente permeáveis (DEMIDOVA & HAMBLIN, 2005). Neste sentido, trabalhos vem sendo desenvolvido utilizando-se a Riboflavina (7,8-dimetil-10-ribitil-isoaloxazina), uma vitamina hidrossolúvel com coloração amarela pertencente ao complexo vitamínico B2, como opção de fotossensibilizador (FS) (ZHU et al., 2021). Portanto, objetivou-se determinar *in vitro* o potencial fototóxico da riboflavina contra *Escherichia coli*.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), no Laboratório de Análises de Leite pertencente ao Centro Mesorregional de Excelência em Tecnologia do Leite (CMETL) região Noroeste da Universidade Estadual de Maringá (UEM). O potencial fototóxico de riboflavina (vitamina B2) contra *Escherichia coli* foi investigado *in vitro*, sendo os testes realizados em quadruplicata. O experimento foi realizado em delineamento fatorial (4 tratamentos x 4 dias) seguindo os tratamentos: Controle = sem inclusão de riboflavina e 3 níveis de inclusão de riboflavina: 62,5µg/mL; 125 µg/mL; 250 µg/mL. Para a avaliação de composição do leite, foi utilizado o equipamento Multi-Analisador de Leite por Ultrassom (Milk analyser-Asko), calibrado para avaliação de leite cru e UHT, realizadas a cada 3 dias (0, 3, 6 e 9 dias). A análise microbiológica foi realizada pela técnica de microdiluição em placa de 24 poços, sendo, 900 µL de solução salina estéril (0,85% p/v) foram distribuídos em cada poço e 900 µL das soluções estoque foram adicionados ao primeiro poço. Alíquotas de 100 µL de suspensão bacteriana padronizada foram inoculadas em cada poço. As placas permaneceram no escuro por 10 min e depois foram iluminadas (luz (LED) azul ($\lambda_{max} = 450$ nm, potência óptica de 2,7 mW cm⁻²) por 5 min. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste Tukey, para isso, foi utilizado o procedimento Proc Mixed do pacote estatístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, EUA). Efeitos foram declarados significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação microbiológica foram observados efeitos significativos para a terapia foto dinâmica ($p < 0,05$). Entretanto não houve efeito para inclusão de Riboflavina ($p > 0,05$). Contudo, o êxito demonstrado no uso da terapia fotodinâmica apenas foi alcançado quando combinado com o fotossensibilizador Riboflavina. Quando associadas à terapia fotodinâmica ocorreu interação entre as moléculas do agente

fotossensibilizador, provocando morte celular através da produção de oxigênio singlete e espécies reativas de oxigênio (Melo et al., 2012).

Tabela 1. Contagem de viabilidade celular de *Escherichia coli* tratado com riboflavina e inativação fotodinâmica de microrganismos.

Concentração de Riboflavina ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Escherichia coli</i> (log UFC/mL)	
	Sem luz	Com luz
0	6,93 \pm 0,03	6,55 \pm 0,03
250	6,96 \pm 0,03	6,48 \pm 0,04
500	6,94 \pm 0,02	6,51 \pm 0,04
1000	6,95 \pm 0,03	6,55 \pm 0,05

¹Controle = sem inclusão de riboflavina; 62,5 = inclusão de 62,5 $\mu\text{L/L}$ riboflavina; 125 = inclusão de 125 $\mu\text{L/L}$ riboflavina; 250 = inclusão de 250 $\mu\text{L/L}$ riboflavina; ²Iluminado = luz (LED) azul (λ_{max} = 450 nm, potência óptica de 2,7 mW cm^{-2}) por 5 min; p-valor = ** 0,0001, * 0,05.

A inclusão da riboflavina demonstrou (Tabela 2) interações para todos os fatores avaliados (Tratamento x Terapia x Dias). Os resultados demonstraram diferença média de 6,28% entre o tratamento controle e os demais com inclusão de riboflavina na variável gordura. Para a variável Proteína (P) e lactose (L) (Tabela 2) a inclusão da riboflavina não apresentou efeitos para os tratamentos avaliados ($p < 0,1188$). Na avaliação realiza em fator dos dias, efeitos foram declarados significativos sendo ($p < 0,0006$; $p < 0,0001$) para ambas as variáveis avaliadas proteína e lactose. Contudo, foram observadas interação significativa para os fatores (Tratamento x Terapia x Dias) determinados nas variáveis Proteína e Lactose. Contudo, entende-se essas variações serem atribuídas à alimentação fornecida ao animal, à raça, ao período de lactação, dentre outros (SILVA et al., 2012), sendo a gordura o nutriente de maior variação em relação as demais.

Tabela 2. Composição química de leite tratado com riboflavina e inativação fotodinâmica de microrganismos.

Tratamento ¹	Terapia ²	Dias ³	Variáveis ⁴		
			G	P	L
Controle	Iluminado	0	3,15	3,05	4,50
		3	3,30	3,12	4,61
		6	3,23	3,04	4,51
		9	3,22	3,07	4,56
	Sem Luz	0	3,15	3,03	4,50
		3	3,21	3,11	4,61
		6	3,20	3,04	4,50
		9	4,15	3,44	5,12

62,5	Iluminado	0	3,06	3,11	4,61
		3	3,16	3,16	4,70
		6	3,12	3,11	4,61
		9	3,14	3,13	4,65
	Sem Luz	0	3,04	3,08	4,57
		3	3,15	3,19	4,72
		6	3,11	3,10	4,61
		9	3,14	3,15	4,67
125	Iluminado	0	3,05	3,09	4,58
		3	3,18	3,19	4,73
		6	3,14	3,13	4,65
		9	3,15	3,13	4,65
	Sem Luz	0	3,04	3,08	4,57
		3	3,12	3,12	4,65
		6	3,10	3,09	4,58
		9	3,15	3,14	4,66
250	Iluminado	0	3,03	3,09	4,59
		3	3,16	3,16	4,69
		6	3,11	3,09	4,60
		9	3,17	3,13	4,64
	Sem Luz	0	3,07	3,11	4,61
		3	3,16	3,16	4,69
		6	3,11	3,10	4,60
		9	3,16	3,14	4,63
CV (%) ⁵			0,96	0,24	0,03
SD ⁶			0,03	0,79	0,75
<i>p-valor</i> ⁷					
Tratamento (A)		< 0,0001	0,1188	0,0628	
Terapia (B)		< 0,0001	0,0006	0,0001	
Dia (C)		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	
Ef, Int, Ax B		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	
Ef, Int, Ax C		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	
Ef, Int, Bx C		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	
Ef, Int, Ax Bx C		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	

¹Controle = sem inclusão de riboflavina; 62,5 = inclusão de 62,5µL/L riboflavina; 125 = inclusão de 125µL/L riboflavina; 250 = inclusão de 250µL/L riboflavina; ²Iluminado = luz (LED) azul (Amax = 450 nm, potência óptica de 2,7 mW cm⁻²) por 5 min; ³Dias de avaliação; ⁴G = gordura; P = Proteína; L = Lactose; ⁵CV (%) = coeficiente de variação; ⁶SD = desvio padrão; ⁷p-valor = ** 0,0001, * 0,05.

CONCLUSÕES

O uso da terapia fotodinâmica foi efetiva na redução das colônias de *Escherichia coli*, entretanto a inclusão de Riboflavina não apresentou efeito. Portanto, o fotossensibilizador e o uso de comprimento de onda adequado representam tratamento promissor frente a bactérias Gram negativas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPQ pela concessão da bolsa e ao grupo de pesquisa EEQUAM-UEM e ao INCTleite/UEL por todo apoio na execução do projeto.

REFERÊNCIAS

DEMIDOVA, T. N., HAMBLIN, M. R., 2005. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(6), 2329- 2335.

SILVA, G; ARAUJO, A. M; FERREIRA, M. P.B. Processamento de leite. Curso técnico em alimentos. Recife: **EDUFRPE**, 167 p. 2012.

ZHU, S., SONG, Y., PEI, J., XUE, F., CUI, X., XIONG, X., & LI, C. (2021). The application of photodynamic inactivation to microorganisms in food. *Food Chemistry: X*, 12, 100150.

Melo, L. S. A.; Gomes, A. S. L.; Saska S.; Nigoghossian, K.; Messaddeq, Y.; Ribeiro, S. J. L.; Araujo, R. E. Singlet Oxygen Generation Enhanced by Silver-Pectin Nanoparticles. *Journal of Fluorescence*, v. 22, p. 1633–1638, 2012.