

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE TERAPIA FOTODINÂMICA COM NANOFIBRAS ELETROFIADAS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA E CURCUMINA

Arthur Girardi Francalin Laureano (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Jane Martha Gratton Mikcha (Orientador). E-mail: arthurgf.laureano@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Agrárias / Ciência de Alimentos.

Palavras-chave: Curcumina; nanofibra; bactérias.

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma tecnologia que utiliza oxigênio molecular, luz visível e um fotossensibilizador para gerar espécies reativas de oxigênio. Na indústria alimentícia, a TFD é uma alternativa eficaz, segura e com baixo impacto nas características físico-química dos alimentos. Um exemplo de fotossensibilizador é a curcumina, um curcuminoide, extraído da *Curcuma longa*, de significativas propriedades antimicrobiana quando associada à terapia fotodinâmica. A eletrofiação de nanofibras permite incorporar em sua matriz uma molécula de interesse, nesse caso, como proposta para aumentar a disponibilidade dos curcuminoídeos lipossolúveis. O desenho experimental avaliou a viabilidade de células plantônicas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922, após um período de contato de 4 horas com a nanofibra eletrofiada com curcumina e nanopartículas de prata, em um processo de dessorção por uma solução de PBS e Tween®, exposto a 30 minutos de iluminação. Os resultados evidenciaram a ação antimicrobiana dos curcuminoídeos, o que incide no sucesso de dessorção do fotossensibilizador da nanofibra; no entanto, ligeiras inibições associadas ao fluido de dessorção também foram observadas, estudos complementares podem elucidar as interferências experimentais.

INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica “TFD” é uma tecnologia que se baseia em três pilares: oxigênio molecular, luz visível e um fotossensibilizador. A interação dessas partes leva à geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) altamente citotóxicas que interagem com o material genético de microrganismos planctônicos ou em biofilme, inativando-os sem indução de processos de resistência (do Prado-Silva *et al.* 2022). Na indústria de alimentos, a TFD se mostra como uma potencial alternativa aos métodos padrão, com um baixo consumo energético, simples e de fácil aplicação. A curcumina é um composto ativo purificado da cúrcuma, extraído do rizoma de

Curcuma longa e é aprovado pela Organização Mundial da Saúde e *Food Drug Administration* para uso na indústria alimentícia, seja como corante ou especiaria. Além do uso culinário, a cúrcuma tem sido objeto de estudo como agente antisséptico, antibacteriano, anti-inflamatório, no tratamento de feridas, queimaduras e fotossensibilizador, uma vez que produz EROS quando exposta à luz azul em faixa de absorção de 400 a 500nm, resultando em um efeito bactericida, todavia, por se tratar de um composto hidrofóbico sua aplicação pode ser dificultada (Penha et al., 2017). Fibras poliméricas nanoestruturadas garantem capacidade de portar biomateriais como meio para incorporação de fármacos bioativos, entre eles, os fotossensibilizadores e nanopartículas metálicas. Sua propriedade de veiculação de fármacos se deve ao seu próprio processo de síntese por meio da eletrofição, que consiste na aplicação de um campo eletrostático para produzir fibras a partir de um capilar contendo o polímero solubilizando os compostos ativos, após a eletrofição esse bioativo está aprisionado na estrutura da nanofibras e poderá ser liberado gradativamente. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de nanofibras eletrofiadas com curcumina e nanopartículas de prata e curcumina, em fluido de dessorção de pH 7,0, contra cepas padrão de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

MATERIAIS E MÉTODOS

As nanofibras eletrofiadas compostas pela blenda polimérica de Policaprolactona (PCL) e Plurônico® F-127 incorporadas com nanopartículas de prata e curcumina tal como o fluido de dessorção (PBS+ Tween® (polisorbato 80)) pH 7,0 foram preparados e fornecidos em parceria com o grupo de pesquisa NUPESF do Departamento de Química da UEM; estes materiais foram submetidos à testes de esterilidade a fim de avaliar contaminação externa da formulação. O material foi fracionado e adicionado em caldo nutritivo BHI (*Brain Heart Infusion*), Ágar TSA (*Tryptic Soy Agar*), Ágar Teague e Ágar Baird-Parker e incubado a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 24h.

O desenho experimental avaliou a contagem bacteriana de células plantônicas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922 sob os seguintes controles:

- Controle fluido iluminado (fluido + inóculo + luz);
- Controle fluido escuro (fluido + inóculo);
- Controle inóculo iluminado (salina 0,85% + inóculo + luz);
- Controle inóculo escuro (salina 0,85% + inóculo);
- Controle fotossensibilizador (nanofibra + fluido + inóculo);
- Controle positivo do dia (fluido + inóculo)

A avaliação da TFD foi conduzida da seguinte forma: o estoque bacteriano foi reativado em caldo nutritivo BHI à $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 24h, então semeado em Ágar Baird-Parker à $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 48h, as colônias características foram tocadas e incubadas em BHI à $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 16-18h. O crescimento bacteriano foi padronizado em 10^7 UFC/mL. O preparo do fotossensibilizador foi feito incluindo 1cm^2 da nanofibra de curcumina

eletrofiada com partículas de prata em fluído de dessorção previamente preparado e armazenado sob refrigeração. O inóculo padronizado foi adicionado em uma proporção de 5% do volume total (250µL de inóculo 10^7 UFC/mL para 4,75mL de fluído), esta solução então foi submetida à uma incubadora do tipo *shaker* a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 4h. Após esse período, o conteúdo dos tubos foram transferidos para uma placa de 96 poços, incubadas em escuro por 10 minutos e em seguida iluminadas por 30 minutos com o auxílio de um sistema de luz diodo emissor de luz (LED), composto por 20 diodos emissores de luz (LED) azul (3W) com irradiância de 16 mW/cm^2 e comprimento de onda de 450nm. Após a TFD o conteúdo dos poços foi diluído seriadamente até a diluição 10^{-5} e semeada em Ágar TSA; as placas foram incubadas à $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 24h. As colônias forma contadas e o logaritmo das UFC/mL foi calculado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos testes de esterilidade realizados, não foi constatado crescimento bacteriano, no limite da técnica usada, em nenhum dos ensaios, indicando a qualidade da nanofibra e fluído. Os controles do desenho experimental revelaram não haver atividade antimicrobiana nos componentes da experimentação, de forma isolada (tabela 1).

Controles <i>S. aureus</i> ATCC 25923	Log UFC/mL	Controles <i>E. coli</i> ATCC 25922	Log UFC/mL
Controle Fluído Iluminado	7,16	Controle Fluído Iluminado	7,77
Controle Fluído Escuro	7,18	Controle Fluído Escuro	6,6
Controle Inóculo Iluminado	6,94	Controle Inóculo Iluminado	7,7
Controle Inóculo Escuro	6,93	Controle Inóculo Escuro	7,67
Controle Fotossensibilizador	7,05	Controle Fotossensibilizador	0
Experimento <i>S. aureus</i> ATCC 25923	Log UFC/mL	Experimento <i>E. coli</i> ATCC 25922	Log UFC/mL
4h pH 7 com 30' TFD	0	4h pH 7 com 30' TFD	0
Controle positivo do dia	6,41	Controle positivo do dia	6,6

Tabela 1. Distribuição do Log UFC/mL obtido dos ensaios. Todos os ensaios realizados com 4h de contato, no pH 7, com 30 minutos de iluminação.

Nota-se a inibição do crescimento bacteriano tanto de *S. aureus* (Coco Gram-positivo), quanto de *E. coli* (Bacilo Gram-negativo). A inibição de bactérias Gram-negativas é interessante uma vez que esse grupo naturalmente possui resistência à compostos lipossolúveis, como os curcuminoides, já que o influxo de substâncias para o citoplasma depende da permeabilidade seletiva de porinas da membrana externa (Barros, 2021). No entanto, para *E. coli* também há uma inibição do controle fotossensibilizador, alertando para uma possível ação tóxica do curcuminóide, mesmo sem iluminação. Uma ligeira diminuição da viabilidade dos controles fluído também é perceptível, um detalhe crucial visto que o Tween® (polisorbato 80), é um emulsificante e surfactante químico que também possui atividade antimicrobiana em

determinadas concentrações (Kaur, 2017), o que sugere uma interferência experimental sutil advinda do fluído de dessorção.

CONCLUSÕES

O sistema inédito testado é promissor no que tange à liberação do curcuminoide da nanofibra tal como o potencial oxidativo do fotossensibilizador potencializado por nanopartículas de prata, principalmente em *S. aureus*, como esperado pela literatura. Sua ação em *E. coli* deve ser explorada a fim de confirmar inibição bacteriana advinda da TFD ou toxicidade da curcumina. O fluído de dessorção, essencial para liberação dos curcuminoídeos veiculados à nanofibra, no entanto, precisa passar por avaliações minuciosas para determinar sua interferência antimicrobiana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro à pesquisa e a equipe do DAB/UEM.

REFERÊNCIAS

BARROS, Carla Luana Neres de. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos tradicionais e ayurvédicos de *Curcuma longa* L. 2021. 75 f., il. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Farmácia) — Universidade de Brasília, Brasília, 2021. <https://bdm.unb.br/handle/10483/37325>.

do PRADO-SILVA, L.; et al. Antimicrobial photodynamic treatment (aPDT) as an innovative technology to control spoilage and pathogenic microorganisms in agri-food products: An updated review. **Food Control**, v. 132, 108527, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108527>.

KAUR, Gurpreet; MEHTA, S. K. Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications. **International journal of pharmaceuticals**, v. 529, n. 1-2, p. 134-160, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.059>.

PENHA, C. B. et al. Photodynamic inactivation of foodborne and food spoilage bacteria by curcumin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 198–202, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.037>.